



UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

Pseudomonas aeruginosa na otite externa em animais de companhia:
resistência aos antimicrobianos

CLÁUDIA MARCONI

Constituição do Júri

Doutor José Henrique Duarte Correia
Doutora Maria Constança Matias Ferreira
Pomba
Doutora Ana Mafalda Gonçalves Xavier
Félix Lourenço

Orientadora

Doutora Maria Constança Matias Ferreira
Pomba

2019
Lisboa



UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

Pseudomonas aeruginosa na otite externa em animais de companhia:
resistência aos antimicrobianos

CLÁUDIA MARCONI

Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Constituição do Júri

Doutor José Henrique Duarte Correia
Doutora Maria Constança Matias Ferreira
Pomba
Doutora Ana Mafalda Gonçalves Xavier
Félix Lourenço

Orientadora

Doutora Maria Constança Matias Ferreira
Pomba

2019
Lisboa

Agradecimentos:

Agradeço a Professora Doutora Constança Pomba por tão bem me receber em sua equipa de trabalho no Laboratório de Resistência a Antimicrobianos e Biocida, a toda a equipa do laboratório – Juliana Menezes, Pamela Valente, Catarina Aboim, Catia Marques e , principalmente a Engenheira Adriana Belas que esteve comigo, a ensinar e corrigir meus erros. Agradeço a meu marido Wilson Guimarães pela paciência ao longo deste processo e a minha família que está no Brasil a torcer pelo meu sucesso.

Muito obrigada.

Resumo

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria patogénica frequente na etiologia da otite externa crónica em animais de companhia, e o tratamento dessas infecções está se tornando problemático devido ao aumento do número de estirpes multirresistentes (MDR). Este estudo teve como objetivo detectar e avaliar a frequência de *P. aeruginosa* causadora de otite externa e caracterizar sua resistência antimicrobiana.

Um total de 64 isolados de *P. aeruginosa* de otite externa de animais de companhia foram identificados por PCR. Todos os isolados foram testados contra 15 antimicrobianos anti-pseudomonas pela determinação da concentração inibitória mínima. Os fenótipos de susceptibilidade antimicrobiana foram interpretados de acordo com *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI).

As frequências de resistência observadas foram, da maior para a menor: Colistina (56.3%, n=36/64), Norfloxacin (51,6%, n=33/64), Gentamicina (34%, n=23/64), Amicacina (32,9%, n=21/64), Ciprofloxacina (25%, n=16/64), Levofloxacina (21,9%, n=14/64), Cefepima (12,5%, n=8/64), Aztreonam e Tobramicina (7,9%, n=5/64), Imipenem (6.3%, n=4/64), Piperaciclina/tazobactam (4,7%, n=3/64), Cefepima, Ceftazidima e Piperaciclina (1,6%, n=1/64). Não houve resistência ao Doripenemo nem ao Meropeneme. A pesquisa por PCR para detecção de genes que codificam as enzimas metalo β -lactamases sub-classes VIM, IMP e SPM nas amostras resistentes ao Imipeneme teve resultado negativo, assim como a pesquisa para a enzima AAC (6') – Ib nas amostras resistentes a Ciprofloxacina e Gentamicina.

O teste de suscetibilidade antimicrobiana neste estudo demonstrou altos níveis de resistência para as classes de fluoroquinolonas de 2ª e 3ª geração, aminoglicosídeos e colistina, assim como foi observado resistência ao Imipeneme. Dado que as classes das fluoroquinolonas e aminoglicosídeos são os principais agentes antimicrobianos utilizados no tratamento da otite externa em animais de companhia e considerados como antimicrobianos criticamente importantes para humanos, fica desta forma demonstrada a necessidade de uma terapia antimicrobiana mais precisa e baseada em estudos de susceptibilidade aos antimicrobianos.

Palavras chaves: *Pseudomonas aeruginosa*, resistência a antimicrobianos, otite externa

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is a common cause of chronic otitis externa in companion animals, and treatment of these infections is becoming problematic due to the increasing number of multidrug-resistant (MDR) strains. This study aimed to detect and evaluate the frequency of *P. aeruginosa* causing external otitis and to characterize their antimicrobial resistance.

A total of 64 isolates of *P. aeruginosa* from external otitis from companion animals were identified by PCR. All isolates were tested against 15 antimicrobials antipseudomonal by determination of minimum inhibitory concentration. Antimicrobial susceptibility phenotypes were interpreted according to the *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI).

The frequency of resistance observed were, from the highest to the lowest: Colistin (56.3%, n = 36/64), Norfloxacin (51.6%, n = 33/64), Gentamicin (34%, n = 23/64) (21.9%, n = 14/64), Ciprofloxacin (25%, n = 16/64) (7.8% n = 5/64), Cefepime (12.5%, n = 8/64), Aztreonam and Tobramycin (7.9%, n = 14/64), Imipenem (6.3%, n = 4/64), Piperacycline / tazobactam (4.7% n = 5/64), Cefepime, Ceftazidime and Piperaciline (1.6%, n = 1/64). There was no resistance to Doripenem and Meropenem. PCR analysis for the detection of genes encoding the metallo-lactamases enzymes VIM, IMP and SPM sub-classes in the resistant samples to Imipenem had negative results, as well as the search for the enzyme AAC (6') - Ib in resistant samples Ciprofloxacin and Gentamicin.

The antimicrobial susceptibility test in this study demonstrated high resistance levels for the classes of 2nd and 3rd generation of fluoroquinolones, aminoglycosides and colistin, as well as resistance to Imipenem was observed. Since the classes of fluoroquinolones and aminoglycosides are the main antimicrobial agents used in the treatment of external otitis in companion animals and considered as critically important antimicrobial agents for humans, the need for a more precise antimicrobial therapy based on antimicrobial susceptibility testing.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, antimicrobial resistance, otitis extetrna

Índice

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	OTITE EXTERNA EM ANIMAIS DE COMPANHIA.....	3
2.1.1	<i>Diagnóstico e importância da citologia.....</i>	<i>4</i>
2.1.2	<i>Tratamento.....</i>	<i>5</i>
2.2	CARACTERIZAÇÃO DA ESPÉCIE <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> COMO AGENTE PATOGENICO	7
2.3	USO DE ANTIMICROBIANOS EM OTITES EXTERNAS E A PREOCUPAÇÃO COM O DESENVOLVIMENTO DE RESISTÊNCIAS	9
2.4	TRANSMISSÃO DE BACTÉRIAS RESISTENTES E SEUS GENES ENTRE HOSPEDEIROS E ENTRE HOSPEDEIROS E MEIO AMBIENTE.....	11
2.5	BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES	13
2.6	A RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS É UMA PREOCUPAÇÃO MUNDIAL.....	13
2.6.1	<i>A situação na Europa.....</i>	<i>16</i>
2.7	MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS	17
2.7.1	<i>Resistência a Quinolonas.....</i>	<i>20</i>
2.7.2	<i>Resistência a Aminoglicosídeos.....</i>	<i>20</i>
2.7.3	<i>Resistência a Polimixinas.....</i>	<i>21</i>
2.7.4	<i>Resistência a Carbapenemos.....</i>	<i>22</i>
2.8	SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA E TESTE DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS	23
3	OBJETIVOS	25
3.1	MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1.1	<i>Caracterização das amostras</i>	<i>25</i>
3.1.2	<i>Extração de DNA.....</i>	<i>25</i>
3.1.3	<i>Confirmação da espécie Pseudomonas aeruginosa por Polymerase Chain Reaction ...</i>	<i>26</i>
3.1.4	<i>Teste de suscetibilidade a antimicrobianos e Concentração inibitória mínima</i>	<i>26</i>
3.1.5	<i>Pesquisa de genes de resistência.....</i>	<i>27</i>
4	RESULTADOS.....	28
5	DISCUSSÃO	31
6	CONCLUSÃO.....	37
7	REFERÊNCIAS	38
8	ANEXO 1	47

Lista de Figuras

Figura 1 - Linha do tempo das descobertas dos antimicrobianos (Adaptado de aula proferida pela Professora Constança Pomba em Dezembro/2017).....	1
Figura 2 - Situação de Portugal frente a resistência a antimicrobianos da <i>Pseudomonas aeruginosa</i> entre os anos de 2013 e 2016 (ECDC, 2017).....	16

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Fatores de virulência da <i>P. aeruginosa</i> e seus efeitos no hospedeiro	9
Tabela 2 - Adaptada do documento WHO <i>Critically Important Antimicrobials for Human Medicine</i>	14
Tabela 3 - Lista de oligonucleótidos iniciadores, com respectivas sequências nucleotídicas, tamanho de produto PCR e referência, utilizados na técnica de PCR para confirmação de espécie.	26
Tabela 4 - Lista de oligonucleótidos iniciadores, com respectivas sequências nucleotídicas, tamanho de produto PCR e referência, utilizados na técnica de PCR para pesquisa de genes de resistência <i>bla</i> _{VIM} -, <i>bla</i> _{IMP} e <i>bla</i> _{SPM}	27
Tabela 5 - Lista de oligonucleótidos iniciadores, com respectivas sequências nucleotídicas, tamanho de produto PCR e referência, utilizados na técnica de PCR para pesquisa de genes para a produção da enzima AAC (6') - Ib.	27
Tabela 6 - Resultados das determinações das concentrações inibitórias mínimas realizadas	29
Tabela 7 - trabalhos realizados pelo método da microdiluição (CIM)	32
Tabela 8 - trabalhos realizados pelo método de disco difusão (DD).....	32

Lista de Gráficos

Gráfico 1 - Comparação entre o CLSI e o Eucast quanto aos níveis de resistência encontrados	28
Gráfico 2 - percentagem de amostras que são resistentes a determinado número de classes de antimicrobiano	30
Gráfico 3 - co-resistências dos isolados resistentes ao Imipenem com outros antimicrobianos, tanto pelo CLSI quanto pelo Eucast.....	30

Lista de Abreviaturas

AMP - *Antimicrobial Peptide*

CIA – Antimicrobianos Criticamente Importantes

CIM – Concentração Inibitória Mínima

DD - Difusão de disco

EMA – Agência Europeia de Medicamentos

OMS – Organização Mundial da Saúde

TSA – Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*

Eucast - *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

ECDC - Centro Europeu de Prevenção e Controlo das Doenças

Tris - Trometamina

EDTA – Ácido *etilenodiaminotetracético*

PCMX - *Parachlorometaxileno*

ESKAPE – *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa* e *Enterobacter spp.*,

MRSP - *Staphylococcus pseudintermedius* metilina resistentes

MRSA - *Staphylococcus aureus* metilina resistente

ST 233 - Sequence Type 233

Omps - Outer membrane proteins

ESBL - Extended spectrum beta lactamase

MDR – Multidrug resistance

MBL - Metallo-carbapenemases

IMP - Imipenemase

VIM - Verona imipenemase

NDM - New Delhi Metallo-beta-lactamase

SPM - São Paulo Metallo-β-lactamase

PMQR - *Plasmid-Mediated Quinolone Resistance*

QNR – *Quinolone Resistance protein*

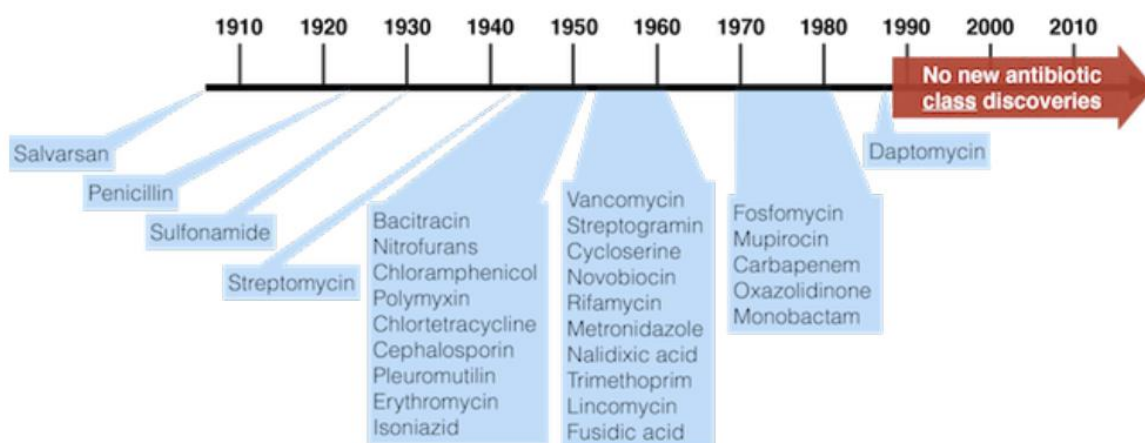
QRDR - Região determinante da resistência à quinolona

Mβls - Metallo-β-Lactamases

1 Introdução

A adoção de agentes antimicrobianos na medicina humana e medicina veterinária foi uma das conquistas médicas mais significativas do século XX. Os primeiros agentes antimicrobianos foram introduzidos na década de 1930, e um grande número de fármacos foram descobertos nas décadas seguintes, embora não haja novas classes descobertas desde a década de 90 (Figura 1). Com o uso de antimicrobianos começou a surgir a resistência a estes fármacos, sendo a sua própria administração um fator de risco comum para o surgimento de bactérias resistentes. O uso de antimicrobianos em animais, tanto de produção como de companhia, também foi identificado como um dos fatores de risco para colonização e/ou infecção por agentes patogénicos resistentes em seres humanos. O surgimento de resistência antimicrobiana em animais pode ter sérias consequências e portanto, representa um risco para a saúde humana e animal, não devendo ser então subestimada, pois reduz a eficácia dos antimicrobianos no tratamento, podendo tornar procedimentos como transplantes de órgãos, quimioterapia para o cancro, cuidados com bebês prematuros ou mesmo procedimentos cirúrgicos comuns, impossíveis de serem realizados com segurança (Centro Europeu de Prevenção e Controlo das Doenças [ECDC], 2017).

Figura 1 - Linha do tempo das descobertas dos antimicrobianos (Adaptado de aula proferida pela Professora Constança Pomba em Dezembro/2017)



Os animais de companhia ganham cada vez mais espaço nas famílias, convivendo de forma bastante próxima com seus proprietários e este comportamento propicia a partilha de bactérias entre eles. Evidências mostram que bactérias resistentes e, mesmo bactérias resistentes a diferentes classes de antimicrobianos se espalham entre animais e seres humanos, embora a direção da transferência seja muitas vezes difícil de provar. No entanto,

o uso de antimicrobianos em animais de companhia implica na seleção, bem como no potencial de abrigar e disseminar a resistência aos antimicrobianos, o que constitui um risco potencial para a saúde pública (Argudín *et al.*, 2017; Pomba *et al.*, 2017; Dotson & Hyatt, 2008; Guardabassi, Schwarz, & Lloyd, 2004).

A otite externa canina é uma patologia que requer muitas vezes tratamento recorrente e por vezes longo com antimicrobianos de uso tópico. As otites com infecção por *Pseudomonas aeruginosa* estão normalmente associadas a casos crônicos e representam um problema especial por tão poucos antimicrobianos serem ativos contra este microrganismo, devido as suas resistências intrínsecas, além de possuir grande capacidade de adquirir novas resistências, até mesmo durante o tratamento. Embora seja considerada uma boa prática avaliar os resultados da citologia do ouvido e das culturas microbianas, o tratamento da otite externa é mais comumente realizado de forma empírica, baseado na otoscopia, citologia e experiência do médico veterinário. O tratamento nos animais utiliza antimicrobianos das mesmas classes que os usados em seres humanos, fluoroquinolonas, β -lactâmicos e aminoglicosídeos principalmente (Forster, Real, Doucette, & King, 2018; Perry, MacLennan, Korven, & Rawlings, 2017).

Preocupada com o desenvolvimento de resistência antimicrobiana em agentes patogênicos humanos e animais, incluindo organismos zoonóticos e bactérias comensais, a Organização Mundial de Saúde (OMS) classifica os antimicrobianos quanto à sua importância na medicina humana em antimicrobianos criticamente importantes (CIA), e devem ser utilizados com prudência, tanto em medicina humana como em medicina veterinária, sendo, em alguns casos, destinados a uso exclusivamente humano (World Health Organization [WHO], 2017).

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Otite externa em animais de companhia

A otite externa é a inflamação do duto auditivo externo, desde o pavilhão auricular até a membrana timpânica, e é comumente diagnosticada em pacientes caninos na prática veterinária de animais de companhia, podendo corresponder a até 20% dos atendimentos clínicos.

Ela pode ser classificada quanto à sua lateralidade em uni ou bilaterais, sua evolução pode ser aguda, crônica ou crônica recidivante, e a inflamação tanto pode ser no ouvido externo, médio e/ou interno. Quanto a classificação clínica a otite pode ser ceruminosa, eczematosa, purulenta, hiperplásica e estenosante. De etiologia multifatorial e complexa a otite é sempre um desafio para o médico veterinário (Forster *et al.*, 2018; Perry *et al.*, 2017).

As causas de otite externa são, segundo Paterson (2016) e Nuttall (2016), divididas em:

- Fatores primários (alergia, parasitas, alterações de queratinização e corpos estranhos) que efetivamente causam otite;
- Fatores secundários (bactérias e infecções fúngicas);
- Fatores predisponentes (conformação do canal auditivo e humidade) que isoladamente não provocam otite externa, mas aumentam o risco de seu desenvolvimento;
- Fatores perpetuantes (hiperplasia e estenose) que predispoem à cronicidade da otite dificultando o sucesso do tratamento clínico.

As doenças alérgicas, como a atopia, são as principais causas primárias de otite. Já a infecção por bactérias e/ou leveduras age, por seu turno, como um fator secundário em consequência do processo inflamatório causado pela doença primária ou por fatores predisponentes. O microbioma bacteriano normal do ouvido canino é predominantemente composto por cocos gram-positivos e leveduras, sendo alterado quando há inflamação do duto auditivo. Da análise dos casos agudos de otite externa constata-se comumente a presença de elevado número de bactérias gram-positivas, como *Staphylococcus pseudintermedius*, ao contrário do que ocorre nas alterações inflamatórias crônicas no canal auditivo que leva a um aumento do número de bactérias gram-negativas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus spp.* e *Escherichia coli* (Forster *et al.*, 2018; Paterson & Matyskiewicz, 2018; Zur, Gurevich, & Elad, 2016).

Quando há envolvimento de *P. aeruginosa* a otite caracteriza-se, na maioria dos casos, por sinais de inflamação grave (eritema, edema, dor), ulceração na parte interna dos dutos (em casos mais graves), secreção purulenta e está associada a quadros crônicos da doença. Outros sintomas clínicos são a inclinação e abano da cabeça, dor à manipulação da orelha e odor característico (Barnard & Foster, 2018; Nuttall, 2016; Paterson & Matyskiewicz, 2018; Pye, Yu, & Weese, 2013).

2.1.1 Diagnóstico e importância da citologia

Ainda que a maioria dos proprietários de animais e clínicos veterinários normalmente identifique alterações no ouvido, a inflamação existente é muitas vezes subestimada, o que leva a um ciclo de infecção recorrente e inflamação crônica, provocando alterações patológicas progressivas que podem até mesmo demandar intervenção cirúrgica para ablação do ouvido. Deve-se realçar que a inflamação crônica torna cada recidiva de infecção mais difícil de tratar e que o uso continuado de antimicrobianos pode selecionar bactérias resistentes (Nuttall, 2016).

Para identificar sinais de doença de pele generalizada, como eritema, descamações e prurido que podem ser sugestivos de uma doença de pele alérgica subjacente, é indispensável um exame físico e dermatológico geral. Para um melhor diagnóstico em casos de suspeita de ruptura da membrana timpânica, deve-se analisar se há algum déficit neurológico (inclinação da cabeça, paralisia facial, nistagmo, etc.), além do exame completo do canal auricular com otoscópio, observação direta do cerume ao microscópio (ácaros) e citologia da secreção do ouvido (Natalie Barnard & Aiden Foster, 2018).

O exame citológico deve ser realizado rotineiramente em todos os casos de otite externa, uma vez que esta técnica identifica a existência de infecção ativa (neutrófilos degenerados, fagocitose de agentes patogénicos) e se a infecção é por cocos, leveduras ou bastonetes. A técnica de colheita citológica comumente usada na prática veterinária é a inserção de um cotonete com ponta de algodão na porção vertical do duto auditivo externo, posteriormente cora-se na lâmina de vidro o material recolhido do conduto e observa-se ao microscópio a presença ou não de microrganismos, presença de material amorfo (biofilme) (Barnard & Foster, 2017; Choi, Edginton, Griffin, & Angus, 2018). Caso a citologia indique infecção por bastonetes, a identificação através da cultura e a realização do teste de sensibilidade a antimicrobianos (TSA) torna-se imprescindível, pois nestes casos a prescrição de uma terapia empírica pode resultar em tratamento inadequado devido a padrões de resistência altamente variáveis em bactérias gram-negativas. Assim, o teste de suscetibilidade antimicrobiana deve ser um passo crucial na seleção da terapia tópica apropriada, principalmente nos casos de otites crônicas (Rubin, Walker, Blickenstaff, Bodeis-Jones, & Zhao, 2008).

2.1.2 Tratamento

Os principais passos para uma terapia bem-sucedida segundo Paterson (2018) e Bateman, Moss, Trott, & Shipstone (2012), são:

1. Diagnosticar e tratar doenças de pele primárias que afetam o ouvido;
2. Identificar e tratar infecções secundárias;
3. Reconhecer quaisquer fatores perpetuantes ou predisponentes e gerenciá-los para prevenir a recorrência da doença.

Se a otite fizer parte de uma doença cutânea alérgica mais generalizada, o tratamento pode muitas vezes ser realizado com o uso de fármacos sistêmicos ou com imunoterapia específica para alérgenos. Em alguns cães, a alergia afeta apenas os ouvidos, ou os afeta mais do que outras áreas do corpo, nestes casos a medicação oral para a alergia é inadequada no controle da otite externa e é necessária terapia tópica, já que os medicamentos administrados pela via tópica atingem uma concentração muito maior no sítio da infecção do que quando administrados pela via oral (Buckley, McEwan, & Nuttall, 2013; Guardabassi *et al.*, 2017; Paterson, 2016). Em 2009 Cole *et al.* constatou que a concentração plasmática e a concentração na pele do duto auditivo da enrofloxacin e ciprofloxacina após administração intravenosa de enrofloxacin em cães com otite externa crônica, com indicação de ablação do duto, não alcançou valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) compatíveis com o indicado para obter eficácia clínica.

Embora não existam diretrizes padronizadas para o tratamento da otite externa canina, os médicos veterinários comumente utilizam formulações tópicas comerciais desenvolvidas para essa indicação. Esses medicamentos geralmente incluem um produto de limpeza auricular para retirada de cerume, detritos celulares e pus, e outro com uma combinação de antimicrobiano de amplo espectro, um antifúngico e um glucocorticóide para reduzir a inflamação e diminuir rapidamente a dor e o desconforto (Blair, Webber, Baylay, Ogbolu, & Piddock, 2015; Forster *et al.*, 2018; Lupo, Haenni, & Madec, 2018; Nuttall, 2016). Embora seja considerada uma boa prática avaliar os resultados da citologia do ouvido e das culturas microbianas, o tratamento da otite externa é mais comumente realizado de forma empírica, baseado na otoscopia, citologia e experiência do médico veterinário (Bugden, 2013; Nuttall, 2016). Como dito anteriormente, devido a padrões de resistência altamente variáveis das bactérias gram-negativas, a terapia empírica pode resultar em tratamento inadequado no caso de otite externa por *P. aeruginosa* e de acordo com diversos autores (Beier *et al.*, 2015; Guardabassi *et al.*, 2004; Harada, Arima, Niina, Kataoka, & Takahashi, 2012; Pomba *et al.*, 2017; Vingopoulou *et al.*, 2018; Wildermuth, Griffin, Rosenkrantz, & Boord, 2007) o uso prévio de fluoroquinolonas em animais de companhia está associado ao aumento de resistência observado em *P. aeruginosa* isolada de otites, ou seja, o tratamento empírico

com fluoroquinolonas não deve ser prescrito quando há suspeita de infecção por *P. aeruginosa*.

Além dos mecanismos de resistência da *P. aeruginosa* aos antimicrobianos, esta bactéria é ainda capaz de formar biofilmes como mecanismo de defesa, fator que não deve ser desprezado no tratamento. A formação de biofilmes é comum, mas subdiagnosticado, embora possa ser identificado em exames por otoscopia ou citologia. Clinicamente, os biofilmes formam uma secreção aderente, espessa e viscosa, geralmente castanho escura ou preta. No exame citológico, é visualizado como material semelhante a véu, de espessura variada, que pode dificultar a visualização de bactérias e células. Os biofilmes são clinicamente importantes no tratamento pois inibem a limpeza do conduto auditivo, impedem a penetração de antimicrobianos e fornecem um reservatório protegido de bactérias. (Nuttall, 2016). Segundo Pye, C. C., Yu, A. A. & Weese, S. (2013), das 83 amostras de *P. aeruginosa* estudadas 40% produzia biofilme *in vitro*, com a CIM significativamente mais alta do que aquelas que não o produziam.

Diante das já descritas dificuldades no tratamento da otite externa em animais de companhia, diferentes moléculas e combinações de fármacos tem sido estudados. Os autores May, Conklin, & Bemis (2016) estudaram a molécula N-acetilcisteína e perceberam sua eficácia na inibição do crescimento *in vitro* de isolados de *P. aeruginosa* provenientes de otites externas, sendo assim uma boa alternativa na suspeita de formação de biofilmes. Em outro estudo (Ghibaud et al., 2016) foi testada *in vitro* a combinação do antimicrobiano peptídico AMP 2041, clorexidina e Tris-EDTA obtendo sucesso na inibição do crescimento da *P. aeruginosa*.

A combinação do trometamina (Tris), com o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), é comumente utilizada em combinação entre si ou com outros fármacos, para tratar otites com *P. aeruginosa* devido à sua ação na parede celular de bactérias gram-negativas facilitando a penetração dos antimicrobianos na célula (Buckley et al., 2013; Pye, Singh, & Weese, 2014). Em um estudo com nove produtos veterinários com indicação para limpeza do canal auditivo, foi observada a inibição do crescimento da *P. aeruginosa* em seis, sendo que em dois (Tris-EDTA com clorexidina e o outro uma combinação de ácido láctico, ácido salicílico e *parachlorometaxyleno*-PCMX) não houve crescimento bacteriano mesmo com concentrações baixas dos fármacos (Swinney, Fazakerley, McEwan, & Nuttall, 2008).

Na Austrália, o antimicrobiano da família das penicilinas - Ticarcilina é utilizado com sucesso nas otites externas com *P. aeruginosa* (Bateman et al., 2012).

Estudos com a Sulfadiazina de Prata para tratamento de otites com *P. aeruginosa* oferecem uma boa perspectiva contra o problema das resistências a antimicrobianos (von Silva-Tarouca, Wolf, & Mueller, 2019; Boyd, Santoro & Gram, 2019).

O efeito bactericida do mel medicinal e sua eficácia contra *P. aeruginosa* vem sendo estudado em pacientes humanos com queimaduras e em animais tanto para feridas quanto para otites externas. Tanto em seres humanos como em animais, o mel mostra-se promissor para combater a *P. aeruginosa* (Boekema, Pool, & Ulrich, 2013; Maruhashi *et al.*, 2016).

2.2 Caracterização da espécie *Pseudomonas aeruginosa* como agente patogénico

O microorganismo patogénico bacteriano atualmente conhecido como *Pseudomonas aeruginosa* recebeu vários nomes ao longo de sua história com base na coloração azul-verde característica produzida durante a cultura. Sedillot em 1850 foi o primeiro a observar que a coloração de curativos cirúrgicos foi associada a um agente transferível. O pigmento responsável pela coloração azul foi extraído por Fords em 1860 e, em 1862, Lucke foi o primeiro a associar esse pigmento a organismos em forma de bastão. Entretanto a *P. aeruginosa* não foi isolada com sucesso em cultura pura até 1882, quando Carle Gessard relatou em uma publicação intitulada "Sobre a coloração azul e verde de bandagens" o crescimento do organismo em feridas cutâneas de dois pacientes com pus verde-azulado. Em vários relatos adicionais, entre 1889 e 1894, a *P. aeruginosa* (anteriormente *Bacillus pyocyaneus*) foi descrita como o agente causador da purulência azul-verde nas feridas dos pacientes. Uma apresentação mais completa sobre as rotas de invasão e disseminação de *P. aeruginosa*, levando à infecção aguda ou crónica, foi fornecida por Freeman em um artigo de 1916 (Lister, Wolter, & Hanson, 2009).

P. aeruginosa tem como características ser uma bactéria bastonete gram-negativa, aeróbia, não fermentadora de lactose, oxidase positiva, pouco exigente nutricionalmente e com grande capacidade de adaptação metabólica, permitindo-lhe prosperar de forma extraordinária em uma variada gama de nichos ambientais. É frequentemente encontrada na água e no solo, sendo patogénica tanto para seres humanos, animais de produção e de companhia como para plantas (Argudín *et al.*, 2017; Kerr & Snelling, 2009), desenvolve-se com maior facilidade em ambientes com muita humidade como banheiras, garrafas de água, torneiras, saunas, piscinas e também em equipamentos hospitalares como catéteres e respiradores artificiais (European Centre for Disease Prevention and Control [ECDC] 2017; Morris, Davis, Palmeiro, O'Shea, & Rankin, 2017). Apesar da ampla distribuição de *P. aeruginosa* na natureza e do potencial infeccioso, infecções graves são predominantemente adquiridas em hospitais (ECDC, 2017; Kerr & Snelling, 2009; Lister *et al.*, 2009; Raman, Avendano, Chan, Merchant, & Puzniak, 2018).

P. aeruginosa raramente é um membro da microbiota em seres humanos. Taxas de colonização representativas para locais específicos em humanos são 0 a 2% para a pele, 0

a 3,3% para a mucosa nasal, 0 a 6,6% para a garganta e 2,6 a 24% para amostra fecal. No entanto, as taxas de colonização podem exceder 50% durante a hospitalização (Lister *et al.*, 2009). Como importante agente patogénico oportunista de humanos e animais, é responsável por infeções nosocomiais graves, principalmente em pacientes imunossuprimidos seja por idade avançada, neutropenia devida à quimioterapia ou a imunossupressão devido ao transplante de órgãos. As infeções nosocomiais são de alta incidência em pacientes com imunodeficiência devido à sua frequente necessidade de hospitalizações sendo, dessa maneira, expostos a reservatórios de *P. aeruginosa* no ambiente hospitalar. Além desses pacientes, pessoas com fibrose cística estão muito suscetíveis a pneumonias agravadas pela *P. aeruginosa* (Cabassi *et al.*, 2017; Gellatly & Hancock, 2013; Michl, Beck, & Mainz, 2017).

P. aeruginosa está entre os seis principais agentes patogénicos envolvidos em infeções nosocomiais, em conjunto com *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa* e *Enterobacter spp.*, sendo este grupo conhecido pelo acrónimo ESKAPE. Além de provocar infeções graves, também pode causar infeções ligeiras em pessoas saudáveis, tais como infeções de pele, ouvido e olhos (Cabassi *et al.*, 2017; Hyun, Chung, & Hwang, 2018; Kerr & Snelling, 2009; Lin *et al.*, 2012; Sader, Huband, Castanheira, & Flamm, 2017; Viedma *et al.*, 2012). Em animais de companhia é mais comum em otites externas e médias, piodermites profundas e infeções do trato urinário (Cabassi *et al.*, 2017; Hyun *et al.*, 2018; Lupo, Haenni, & Madec, 2018; Rubin, Walker, Blickenstaff, Bodeis-Jones, & Zhao, 2008).

A infeção por *P. aeruginosa* representa um grande desafio terapêutico, devido à capacidade desse microrganismo ser intrinsecamente resistente a muitos antimicrobianos, incluindo beta-lactâmicos (penicilina G, aminopenicilinas isoladamente ou em combinação com inibidores, cefalosporinas de primeira, segunda e algumas da terceira geração, ertapenem), canamicina, tetraciclina, cloranfenicol, trimetoprim e quinolonas de primeira geração. É também conhecida a sua capacidade de rapidamente adquirir resistências adicionais, mesmo durante o tratamento, de modo que a combinação de resistências intrínsecas e adquiridas pode levar a falhas terapêuticas (Cabassi *et al.*, 2017; Lupo *et al.*, 2018; Rubin *et al.*, 2008).

Além dos mecanismos de resistência, a *P. aeruginosa* apresenta ainda diferentes fatores de virulência que colaboram para a gravidade das infeções causadas (Chatterjee *et al.*, 2016; Gellatly & Hancock, 2013; Pye, Yu, & Weese, 2013; Verove *et al.*, 2012) (Tabela 1).

É importante destacar que a patogenia da *P. aeruginosa* não está relacionada com um único fator de virulência, mas a uma interação precisa e delicada entre os diferentes fatores.

Assim, em consequência, uma colonização eficiente e formação de biofilme pode evoluir para necrose tissular, invasão e disseminação pelo sistema vascular, bem como ativação de respostas inflamatórias locais e sistêmicas (Alhazmi, 2015; Chatterjee *et al.*, 2016).

Tabela 1 - Fatores de virulência da *P. aeruginosa* e seus efeitos no hospedeiro

FATORES DE VIRULÊNCIA	EFEITOS
FLAGELO	Mobilidade
PILI TIPO 4	Aderência à célula hospedeira
T3SS	Sistema capaz de injetar citotoxinas diretamente na célula hospedeira
LIPASES E AS FOSFOLIPASES	Desequilíbrio metabólico, danos tissulares
PIGMENTOS	-Danos aos tecidos endoteliais -Impede o crescimento de outras bactérias -Elimina a atividade ciliar respiratória -Produz danos oxidativos nos tecidos oxigenados
QUORUM SENSING (QS),	Coordenação entre as bactérias
CÁPSULA MUCÓIDE	Capacidade antifagocítica e formação de
EXOPOLISSACARÍDICA	biofilmes

2.3 Uso de antimicrobianos em otites externas e a preocupação com o desenvolvimento de resistências

Nos animais de companhia as causas mais frequentes da necessidade da terapêutica com antimicrobiano são as infecções da pele, otites, infecções respiratórias e infecções do trato urinário. A otite externa é uma patologia que requer frequentemente tratamento repetido e prolongado com antimicrobianos, sendo as classes dos aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e polimixinas rotineiramente usadas para terapia tópica (Nuttall, 2016; Paterson, 2016). Estudos recentes constataam que o uso prévio de antimicrobianos favorece o aparecimento de agentes patogénicos resistentes. Lin *et al.* (2012), encontraram níveis de resistência da *P. aeruginosa* em otites e piodermites de cães mais baixos do que em outros estudos, creditando isso ao fato de que os animais estudados não tinham histórico de uso prévio de antimicrobianos. Por outro lado, Vingopoulou *et al.* (2018) observaram que a resistência a fluoroquinolonas foi significativamente mais elevada em cães tratados sistemicamente com antimicrobianos até 6 meses antes do estudo.

Sempre que agentes antimicrobianos são utilizados, uma pressão seletiva é exercida na qual todas as bactérias suscetíveis são mortas ou inibidas em seu crescimento, e as resistentes sobrevivem, não diferenciando na sua ação as bactérias benéficas ao hospedeiro e as patogênicas. Em consequência, tanto a composição do microbioma do hospedeiro é alterada como também a proporção de bactérias resistentes pode aumentar durante a terapia antimicrobiana. Com o uso frequente do antimicrobiano essa seleção leva ao predomínio das estirpes que sobreviveram, multiplicaram-se e agora são maioria no hospedeiro. Fica claro desta forma, porque em ambientes hospitalares ou comunidades sem qualquer controle no uso desses fármacos o aparecimento de estirpes multirresistentes é mais frequente. (Argudín *et al.*, 2017; Boerlin & White, 2013; Schwarz, Loeffler, & Kadlec, 2017). Esta pressão de seleção imposta às bactérias pelo uso indiscriminado de antimicrobianos, tanto na medicina humana quanto na veterinária, cada dia mais torna-se um problema de saúde pública em todo o mundo (Esposito & Simone, 2017; Guardabassi *et al.*, 2017; Pomba *et al.*, 2017).

O aumento nos níveis de resistência bacteriana a antimicrobianos tem sido objeto de preocupação com diferentes estudos indicando que as bactérias de animais de companhia mostram tendências de resistência crescente a uma ampla gama de agentes antimicrobianos, aliado ao fato de que agentes antimicrobianos aprovados para uso em medicina humana também serem aplicados a animais de companhia (Lupo *et al.*, 2018; Poirel, Cattoir, & Nordmann, 2012; Pomba *et al.*, 2017; Schwarz *et al.*, 2017).

As infecções por *P. aeruginosa* apresentam um problema especial pela existência de tão poucos fármacos ativos contra este microrganismo. Por exemplo, dentre os antimicrobianos β -lactâmicos, alguns são designados como anti-*Pseudomonas*, muito embora as cefalosporinas de espectro alargado (cefalosporina de segunda ou de terceira geração) geralmente ativas contra bactérias entéricas gram-negativas, não são eficazes contra *P. aeruginosa*. A ceftazidima, uma cefalosporina injetável de terceira geração, é exceção, por demonstrar consistente atividade contra *P. aeruginosa* (Papich, 2013).

Esta bactéria pode desenvolver resistência a antimicrobianos quer através da aquisição de genes de resistência em elementos genéticos móveis (plasmídeos) quer através de processos mutacionais que alteram a expressão e/ou função de mecanismos codificados cromossomicamente. Ambas as estratégias de *P. aeruginosa* para o desenvolvimento de resistência a fármacos podem limitar severamente as opções terapêuticas para o tratamento de infecções graves (Lister *et al.*, 2009).

Os aminoglicosídeos são uma das poucas opções de tratamento, usados para tratar otites externas em animais de companhia agravadas por *P. aeruginosa* por aplicação tópica de pomadas. Outras alternativas para aplicações tópicas, incluem polimixinas e fluoroquinolonas, sendo que são estas três classes de antimicrobianos estão incluídas no

critério da OMS, como antimicrobianos criticamente importantes (tabela 1). Já para o tratamento sistêmico de infecções por *P. aeruginosa*, as fluoroquinolonas são uma das poucas opções de tratamento além dos aminoglicosídeos e o uso dessa classe de antimicrobianos deve ser restrito a condições nas quais não há opções alternativas de tratamento disponíveis (European Medicines Agency [EMA] 2008).

2.4 Transmissão de bactérias resistentes e seus genes entre hospedeiros e entre hospedeiros e meio ambiente

O uso inadequado de antimicrobianos em animais de consumo, assim como na prática médica humana ou veterinária, potencializou o risco de infecções intratáveis. O uso intensivo de antimicrobianos em animais pode promover a fixação de genes de resistência em bactérias, que podem ser zoonóticas ou capazes de transferir esses genes para agentes patogênicos adaptados ao homem via contato direto, por alimento ou meio ambiente. O meio ambiente pode ser contaminado quando após o uso e metabolização do antimicrobiano por humanos, animais de companhia ou o seu uso como promotor de crescimento na pecuária, avicultura e piscicultura, ele é liberado para o meio ambiente, via excreção fecal ou urinária ocorrendo desta forma contaminação direta do solo ou lençóis freáticos. Além dos antimicrobianos, as bactérias resistentes também são excretadas e lançadas no esgoto ou diretamente no solo (Argudín *et al.*, 2017; Kümmerer, 2004; Prestinaci, Pezzotti, & Pantosti, 2015; Rhouma, Beaudry, & Letellier, 2016).

Em Portugal são 6,7 milhões de animais de estimação e estima-se que cerca de dois milhões de lares portugueses (54%) possuem pelo menos um animal de estimação (Pinto, 2016). Hoje os animais de companhia (cães e gatos) tem cada vez mais contato com seus donos, frequentam todos os lugares da casa, chegando em alguns casos até mesmo a dormir com seus donos na cama. Este contato próximo cria condições favoráveis para a transmissão de bactérias assim como de seus genes de resistência através do contato direto (acariciar, lambar, ferimentos físicos, etc.) ou pelo ambiente doméstico (contaminação de alimentos, móveis, pisos, carpetes etc.). Devido a este convívio os animais podem funcionar como reservatórios de bactérias multirresistentes e levar a infecções zoonóticas, expondo as crianças a maior risco de contaminação do que os adultos devido ao seu contato físico mais próximo com os animais, bem como com ambientes domésticos compartilhados por animais de estimação. Este contato tão próximo e o uso de agentes antimicrobianos são os principais impulsionadores da ocorrência e propagação de resistência assim como a transmissão de microrganismos resistentes e seus genes entre os humanos; entre animais; e entre humanos, animais e meio ambiente (Argudín *et al.*, 2017; Dotson & Hyatt, 2008; Guardabassi *et al.*, 2004; Pomba *et al.*, 2017).

A resistência a antimicrobianos pode ser transmitida de animais para humanos assim como bactérias causadoras de infecções humanas não diretamente ligadas a animais podem agregar ao seu DNA determinantes de resistência de bactérias com potencial zoonótico. Por exemplo, bactérias humanas transmitidas a animais de estimação podem adquirir genes de resistência do microbioma comensal e serem selecionadas através de tratamento antimicrobiano nesses animais. A eliminação fecal é uma das formas de propagação de bactérias resistentes, aumentando assim a sua disseminação na população humana e no meio ambiente (Argudín *et al.*, 2017; ECDC, 2009; Pomba *et al.*, 2017).

Estudos com *Staphylococcus pseudintermedius* metilina resistentes (MRSP) e *Staphylococcus aureus* metilina resistente (MRSA) demonstram a transmissibilidade destes microrganismos entre animais-humanos e humanos-animais, sendo os proprietários de animais de companhia, médicos e enfermeiros veterinários os mais propensos à contaminação (Lloyd, 2007; Pomba *et al.*, 2017; Schwarz *et al.*, 2017).

Em relação com *P. aeruginosa*, os estudos ainda não conseguiram determinar a direção da transmissão, se do animal para o homem ou o contrário, mas demonstram que há transferência e compartilhamento de *P. aeruginosa* entre homem, animal e meio ambiente. Os autores Michl *et al.* (2017), relatam o caso de uma criança na Alemanha hospitalizada devido a fibrose cística agravada com infecção por *P. aeruginosa* e verificaram que o animal de estimação da casa estava colonizado com *P. aeruginosa*. Enquanto Fernandes *et al.* (2018), relatam um caso de otite externa em cão com a infecção por *P. aeruginosa* e a investigação genômica revelou a transmissão domiciliar do clone hospitalar tipo ST233 de alto risco, no ambiente, sugerindo transmissão humano-animal-ambiente após alta hospitalar do proprietário do animal meses antes. Isto é corroborado por Morris *et al.* (2017), onde os resultados genotípicos encontrados na pesquisa corroboram a hipótese de que os isolados de *P. aeruginosa* derivados dos ouvidos de cães infetados são comumente clonais de isolados derivados de fontes de água domésticas e das bocas de seus companheiros humanos e animais.

Outro estudo demonstra a capacidade que *P. aeruginosa* tem de agregar novos elementos ao seu DNA a partir de outra espécie bacteriana. Foram isolados em seres humanos amostras de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenemos e com resistências adicionais a todas as fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, β -lactâmicos, sendo alguns até não suscetíveis à colistina. Os isolados continham o gene metalo- β -lactamase *bla*_{VIM-2} dentro de um integrão de classe 1. O sequenciamento genômico revelou que o integrão era parte de uma nova região de 35 kb que também incluía um transposão tipo Tn501 e sequências homólogas da ilha genômica de *Salmonella* (SGI2) indicativas de um evento de recombinação entre duas bactérias, no caso, *Salmonella* spp. e *P. aeruginosa* (Perez *et al.*, 2014).

2.5 Bactérias multirresistentes

Apenas resistência antimicrobiana adquirida deve ser levada em consideração na identificação de uma bactéria como multirresistente (MDR). A resistência intrínseca não é relevante para esta classificação. De uma forma geral, uma bactéria MDR tem que ser resistente a três ou mais classes diferentes de antimicrobianas (Magiorakos *et al.*, 2011).

A capacidade que algumas bactérias, incluindo a *P. aeruginosa*, têm de adquirir múltiplos mecanismos de resistência e tornar-se resistentes a diferentes classes de antimicrobianos, muitas vezes durante o tratamento, é particularmente preocupante, uma vez que pode limitar alternativas de tratamento disponíveis para a cura da infecção. Nos países europeus, mais de 10% de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes humanos apresentaram resistência a três ou mais classes de antimicrobianos (European Centre for Disease Prevention and Control [ECDC] 2017).

O número de infecções causadas por bactérias com resistência a mais de 3 classes de antimicrobianos (multirresistente) aumenta em todo o mundo, sendo as alternativas de tratamento para pacientes infetados com bactérias multirresistente, inclusive resistentes a carbapenemos, frequentemente limitadas à terapia combinada ou a agentes antimicrobianos mais antigos, com menor eficácia e mais efeitos colaterais como a colistina. Chega-se até mesmo a situações em que não há mais fármacos eficazes para o tratamento, e, mais grave, atualmente o desenvolvimento de novos fármacos antimicrobianos é praticamente inexistente (Blair *et al.*, 2015; ECDC, 2017; WHO, 2017).

É importante salientar que sem antimicrobianos eficazes, os cuidados intensivos, transplantes de órgãos, tratamentos antineoplásicos, cuidados com bebês prematuros ou mesmo procedimentos cirúrgicos comuns, não seriam possíveis (ECDC, 2017).

2.6 A resistência a antimicrobianos é uma preocupação mundial

Preocupada com o crescente aumento de resistência a antimicrobianos em todo o mundo, a Organização Mundial de Saúde (OMS) fixou dois critérios para classificar os antimicrobianos quanto à sua importância na medicina humana (WHO, 2017):

- C1 - a classe antimicrobiana é a única ou uma das poucas terapias disponíveis para tratar infecções bacterianas graves em pessoas;
- C2 - a classe antimicrobiana é usada para tratar infecções em pessoas causadas por:
(i) bactérias que podem ser transmitidas a humanos de fontes não-humanas, ou (ii) bactérias que podem adquirir genes de resistência de fontes não-humanas.

Tabela 2 - Adaptada do documento WHO *Critically Important Antimicrobials for Human Medicine*.

Antimicrobianos criticamente importantes	C1	C2
Cefalosporinas (3 ^a , 4 ^a e 5 ^a gerações)	Sim	Sim
Glicopeptídeos e lipoglicopeptídeos	Sim	Sim
Macrolídeos e Ketolídeos	Sim	Sim
Polimixinas	Sim	Sim
Quinolonas e fluoroquinolonas	Sim	Sim
Aminoglicosídeos	Sim	Sim
Carbapenemos	Sim	Sim
Lipopeptídeos	Sim	Sim
Ansamícinas	Sim	Sim
Gliciliclinas	Sim	Sim
Monobactams	Sim	Sim
Oxazolidinones	Sim	Sim
Penicilinas (natural, aminopenicilina e antipseudomonais)	Sim	Sim
Antimicrobianos altamente importantes		
Cefalosporinas (1 ^a , 2 ^a gerações e cefamicinas)	Não	Sim
Lincosamida	Não	Sim
Penicilina (anti-staphylococcus)	Não	Sim
Sulfonamidas	Não	Sim
Ácido Fusídico	Não	Sim
Tetraciclínas	Sim	Não
Antimicrobianos importantes		
Bacitracina	Não	Não
Aminociclitolis	Não	Não
Nitrofurantoinas	Não	Não
Nitroimidazóis	Não	Não
Pleurumutílis	Não	Não

Legenda: classes de antimicrobianos prescritas tanto para humanos como para animais, divididas nas três classificações: Criticamente importante; Altamente importante e Importante.

Os antimicrobianos que atendem a ambos os critérios são considerados "criticamente importantes" na medicina humana, os que atendem a apenas um dos critérios são considerados "altamente importantes" e os que não atendem a nenhum dos dois critérios são considerados "importantes" (tabela 1). Para orientar os médicos veterinários no melhor uso dos antimicrobianos pensando no animal e na saúde pública, o *Antimicrobial Advice ad hoc Expert Group* (AMEG), comitê da Agência Europeia de Medicamentos (EMA) baseia-se em quatro pilares (European Medicines Agency, 2018; WHO, 2017):

- Lista da OMS de Antimicrobianos Criticamente Importante (CIA);
- Riscos zoonóticos na Europa;
- Utilização desses agentes antimicrobianos na medicina veterinária;

- Risco de transferência de resistência bacteriana aos seres humanos

Os antimicrobianos classificados como CIA devem ser utilizados com prudência, tanto em medicina humana como em medicina veterinária, sendo, em alguns casos, destinados a uso exclusivamente humano. O uso de fluoroquinolonas e cefalosporinas de terceira e quarta geração deve ser restrito a infecções sem outra alternativa de tratamento e sempre apoiada por testes de suscetibilidade antimicrobiana. No caso dos carbapenemos que não apresentam equivalente em medicina veterinária, a recomendação da OMS é que esta classe de antimicrobianos seja destinada somente à terapêutica em medicina humana (OIE: World Organisation for Animal Health, 2015; Pomba *et al.*, 2017; WHO, 2017).

As classes fluoroquinolonas e cefalosporinas de terceira e quarta geração devem ser usadas na medicina veterinária de acordo com as seguintes recomendações segundo a OIE (2015):

- Não deve ser usado como tratamento preventivo administrado através de alimentos ou água na ausência de sinais clínicos no(s) animal(ais) a ser(em) tratado(s);
- Não deve ser usado como um tratamento de primeira linha, a menos que justificado. Quando usado como um tratamento de segunda linha, idealmente deve ser baseado nos resultados de testes de sensibilidade;
- O uso *extra-label* e *off-label* deve ser limitado e reservado para instâncias onde não há alternativas disponíveis.

Desde 2005, a OMS produz uma lista atualizada regularmente de todos os antimicrobianos usados na medicina humana (principalmente aqueles utilizados também em medicina veterinária), agrupados nas três categorias já citadas acima, com base na sua importância para medicina humana. A lista destina-se a ajudar na gestão da resistência antimicrobiana, assegurando que todos eles, especialmente os criticamente importantes, sejam usados prudentemente tanto em medicina humana quanto em medicina veterinária (WHO, 2017).

A preocupação da OMS é mais do que justificada em vista do crescente consumo de antimicrobianos no mundo. Em 2015 nos Estados Unidos, foi estimado um consumo de antimicrobianos em animais equivalente a 80% do consumo anual de antimicrobianos na população humana – uma fração significativa envolve antimicrobianos importantes na medicina humana no tratamento de infecções comuns como também necessários para realizar procedimentos médicos, como grandes cirurgias, transplante de órgãos e quimioterapia (Van Boeckel *et al.*, 2015). Em 30 países da Europa pesquisados pela EMA em 2016, foram contabilizados os seguintes percentuais entre as classes de antimicrobianos mais vendidos na forma de comprimido para animais de companhia: penicilinas (39%), cefalosporinas de 1ª e 2ª geração (25%), sulfonamidas (10%) e macrólidos (8%) (European Medicines Agency, 2017).

2.6.1 A situação na Europa

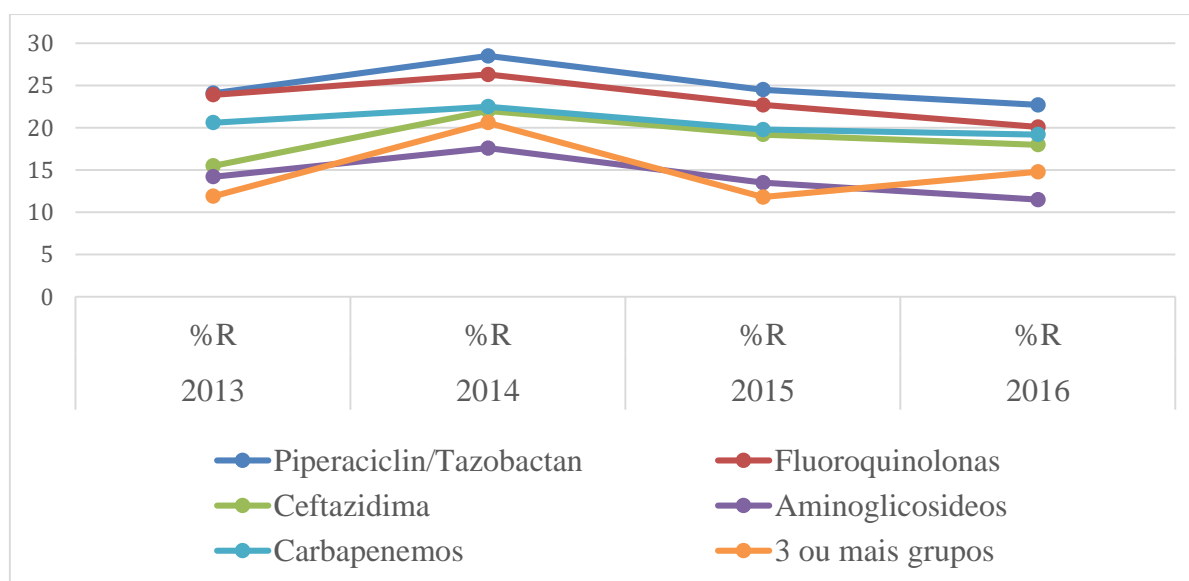
A situação de resistência antimicrobiana na Europa apresenta grandes variações, dependendo das espécies bacterianas, classe de antimicrobiano e região geográfica. Em geral, menores percentagens de resistência foram relatadas em países do norte, enquanto maiores percentagens foram reportadas no sul e leste da Europa. Essas diferenças estão provavelmente relacionadas com variações no uso de antimicrobianos, práticas de prevenção, controle de infeções, diferenças nos padrões de diagnóstico e utilização de serviços de saúde nos países (European Medicines Agency, 2017).

O consumo total de colistina em humanos (administração tópica, inalatória e sistémica combinadas) varia muito entre os países da Área Económica Europeia/UE (UE/EEE), e dobrou em alguns países da UE/EEA entre 2010 e 2014 após o aumento de agentes patogénicos MDR gram-negativos envolvidos em infeções associadas à assistência à saúde (European Medicines Agency, 2013).

Em 2015, 11.788 (8,3%) dos pacientes internados em unidade de terapia intensiva (UTI) por mais de dois dias, apresentaram pelo menos uma infeção associada à assistência à saúde adquirida em UTI (pneumonia, infeção sistémica ou infeção do trato urinário). Destes, 6% apresentaram pneumonia, 4% infeção sistémica e 2% infeção do trato urinário (ITU). O microrganismo mais frequente na pneumonia foi a aqui estudada *P. aeruginosa*, sendo 24% resistentes a Carbapenemos (ECDC, 2017).

Portugal tem taxas de resistência às principais classes de antimicrobianos acima de 10%, demonstrando tendência de queda ao longo dos anos, mas não no grupo das bactérias multirresistentes (figura 2).

Figura 2 - Situação de Portugal frente a resistência a antimicrobianos da *Pseudomonas aeruginosa* entre os anos de 2013 e 2016 (ECDC, 2017).



Legenda: adaptado do documento *Surveillance of antimicrobial resistance in Europe – 2017*.

2.7 Mecanismos de resistência a antimicrobianos

Para compreender os mecanismos de resistência das bactérias a um determinado antimicrobiano é importante conhecer a sua estrutura e mecanismo de ação. Eles agem através da inibição de processos essenciais à multiplicação da célula bacteriana e, em última instância, aos processos essenciais para a sua sobrevivência e podem ser classificados em diferentes grupos em função da estrutura alvo na célula bacteriana, diferenciando-se em (Boerlin & White, 2013; ECDC, 2009):

- Inibição da síntese da parede celular;
- Inibição da síntese ou dano da membrana citoplasmática;
- Inibição da síntese proteica nos ribossomas;
- Alterações na síntese dos ácidos nucleicos;
- Alteração de metabolismos celulares.

A resistência aos antimicrobianos evoluiu como uma resposta natural das bactérias à frequente exposição a estes fármacos, e pode ser definida pela capacidade de resistir às concentrações terapêuticas do antimicrobiano. É dividida em resistência intrínseca e adquirida. A resistência intrínseca é aquela que ocorre naturalmente, é característica de toda a espécie e ocorre sem a necessidade de contato prévio com o antimicrobiano. A resistência adquirida ocorre por sua vez através de mutações espontâneas, que surgem durante o crescimento bacteriano e/ou aquisição de DNA exógeno, por transferência de genes de organismos resistentes para os sensíveis, sendo por isso a mais preocupante devido à possibilidade de disseminação dos genes de resistência a uma população bacteriana. (Blair et al., 2015; Lupo et al., 2018; Schwarz et al., 2017; Tafur & Villegas, 2008; Trott, Moss, See, & Rees, 2007). *P. aeruginosa* apresenta resistência intrínseca a vários antimicrobianos como os β -lactâmicos (exceto monobactam e carbapenemos), as cefalosporinas de primeira e segunda geração, as tetraciclinas, o cloranfenicol e os macrolídeos. Isto ocorre devido a uma combinação de baixa permeabilidade da sua membrana externa e sistemas de bomba de efluxo. (Lupo et al., 2018)

Além da resistência intrínseca, *P. aeruginosa* é capaz de incorporar e gerar variadas resistências adicionais após contato com antimicrobianos ou com organismos já resistentes, seja através de mutações pontuais em genes pré-existentes ou através da transferência horizontal de elementos genéticos moveis. *P. aeruginosa* pode transmitir entre si o material genético que medeia a resistência, ou mesmo a adquirir de outras bactérias gram-negativas, como as da família *Enterobacteriaceae*. Segundo Schwarz et al. (2017); Blair et al. (2015); Li et al. (2015) e Tafur & Villegas (2008), isso pode ser mediado por vários mecanismos, que se dividem de acordo com a forma de inativação do antibiótico:

1. Produção de enzimas que degradam ou modificam antimicrobianos

1.1. Enzimas que degradam antimicrobianos inativam os mesmos pela catálise hidrolítica das moléculas do fármaco. As principais enzimas deste grupo são denominadas β -lactamases e atuam catalisando a hidrólise do anel β -lactâmico, levando à perda da ação do antimicrobiano sobre a bactéria que continua fazendo a biossíntese de sua parede celular. Desde a descoberta e introdução clínica das penicilinas e das sucessivas classes de β -lactâmicos, diversas β -lactamases têm sido descritas e são divididas em dois grandes grupos, as serina β -lactamases (com um aminoácido serina no sítio catalítico das enzimas) e as metalo- β -lactamases ou MBL (que necessitam de um metal como co-fator para a atividade catalítica). Clinicamente, o potencial de degradação das β -lactamases talvez seja o critério mais ilustrativo para classificar essas enzimas: Penicilinases, cefalosporinas, cefamicinas, β -lactamases de espectro alargado (extended spectrum beta lactamase -ESBL) e carbapenemases são as principais representantes. As ESBL são enzimas que possuem potencial para degradar todas as penicilinas, todas as cefalosporinas e monobactâmos (aztreonam), porém a sensibilidade às cefamicinas e carbapenamos geralmente é preservada. Carbapenemases são as β -lactamases com o maior potencial de degradação, e o termo deve-se à capacidade de degradar os antimicrobianos da classe dos carbapenamos. São enzimas codificadas por genes cromossômicos ou plasmídicos.

As carbapenemases adquiridas por plasmídeos possuem destaque na disseminação da resistência e são divididas em dois grupos:

- Metallo-carbapenemases (MBL): tem potencial para degradar todos os beta-lactâmicos, exceto monobactamos (aztreonam). Exemplos: IMP (Imipenemase); VIM (Verona imipenemase); NDM (New Delhi Metallo-beta-lactamase) e SPM (São Paulo Metallo- β -lactamase);
- Serina-carbapenemases: tem potencial para degradar todos os β -lactâmicos.

1.2 Enzimas que modificam antimicrobianos por transferência de grupo(s) químico(s):

A adição de grupos químicos a sítios vulneráveis no antimicrobiano causa a sua perda de funcionalidade impedindo a ligação com a proteína alvo na bactéria. Os aminoglicosídeos são particularmente susceptíveis, as principais enzimas responsáveis são as modificadoras de aminoglicosídeos (AME, *aminoglycoside modifying enzymes*), que alteram a estrutura química destes antimicrobianos, inativando a sua ligação com as subunidades do ribossoma, que são o alvo deste antimicrobiano na bactéria.

2. Redução da permeabilidade da membrana externa:

As bactérias gram-negativas são intrinsecamente menos permeáveis a muitos antibióticos por possuírem membrana externa na constituição de sua parede celular. Para atingir o alvo e agir no meio intracelular, os antimicrobianos devem ultrapassar a membrana externa. Antimicrobianos hidrofílicos (β -lactâmicos, Glicopeptídeos e Aminoglicosídeos) atravessam a membrana externa por difusão passiva através de proteínas na membrana externa denominadas porinas ou Omps (*Outer membrane proteins*). A redução da permeabilidade da membrana externa pode ocorrer por alterações na estrutura das porinas ou mesmo pela perda delas, respectivamente, resultando em permeabilidade mais seletiva ou até mesmo impermeabilidade ao antimicrobiano. Este mecanismo pode afetar principalmente a entrada de antibióticos β -lactâmicos e de fluoroquinolonas.

3. Bombas de efluxo:

As bombas de efluxo são mecanismos naturais de excreção de substâncias tóxicas resultantes do metabolismo bacteriano, que se localizam na parede celular das bactérias e, geralmente, são codificados por genes. Clinicamente o problema ocorre quando estes sistemas têm sua expressão aumentada (hiper-expressão), seja pela maior quantidade destes sistemas na bactéria e/ou atividade maior de excreção (sistemas hiperativos). Nas bactérias gram-negativas, por conta da presença de membrana externa, o sistema de efluxo é geralmente composto por uma proteína transmembranária interna (bomba de efluxo), uma proteína transmembranária externa (porina) e uma proteína que faz a ligação dessas duas proteínas transmembranárias e que compõe o sistema de efluxo da bactéria gram-negativa, geralmente chamado sistema tripartido ou multi-componente.

A atividade dos sistemas de efluxo pode ser inespecífica e excretar diferentes antimicrobianos, de diferentes classes, ou pode ser uma atividade específica. Existem também mecanismos de efluxo adquiridos por plasmídeos, que geralmente não dependem de hiper-expressão.

4. Alteração do sítio alvo (de ligação) do antimicrobiano:

A maioria dos antimicrobianos liga-se especificamente a um ou mais alvos na célula bacteriana. Alterações na estrutura do alvo na célula impedem a eficiente ligação ou diminuem a afinidade dessa interação, desse modo o antimicrobiano não reconhece

mais o alvo na célula bacteriana. Geralmente, alterações do sítio alvo têm origem em mutações em genes da própria bactéria. Essas alterações impedem a ligação dos antimicrobianos, mas não interferem na função do alvo alterado. Assim, a bactéria mantém suas funções e escapa da ação dos antimicrobianos.

5. Proteção ou bloqueio do sítio alvo (de ligação) do antimicrobiano:

A proteção ou bloqueio pode funcionar pela produção de enzimas ou presença de estruturas celulares bacterianas que impedem a ligação do antibiótico ao sítio alvo. Um exemplo de proteção é a produção de enzimas denominadas Qnr, mediada por genes adquiridos (PMQR, *Plasmid-Mediated Quinolone Resistance*), que se ligam e protegem a DNA topoisomerase tipo II contra a ação das quinolonas, o que diminui a sensibilidade destas bactérias aos antimicrobianos dessa classe.

2.7.1 Resistência a Quinolonas

As quinolonas agem inibindo a síntese de ácido nucleico, impedindo a replicação do DNA bacteriano, mais especificamente as enzimas DNA girase (gyrA e gyrB) e topoisomerase IV (parC e parE) (Poirel et al., 2012).

Os principais mecanismos de resistência bacteriana às quinolonas em bactérias Gram-negativas são a modificação de enzimas alvo, com mutações pontuais em uma região determinante da resistência à quinolona (QRDR), específicas nos genes gyrA e gyrB, e topoisomerase IV (parC e parE) e a redução da concentração intracelular de antibiótico devido a uma diminuição na permeabilidade ou a um aumento na expressão de bombas de efluxo (Arais, Barbosa, Carvalho, & Cerqueira, 2016; Poirel et al., 2012; Rubin et al., 2008; Schwarz et al., 2017; Vingopoulou et al., 2018).

Harada et al. (2012), sugere que a resistência a enrofloxacin e orbifloxacin ocorre com ou sem mutação em QRDR sendo a expressão das bombas de efluxo importante para a resistência, enquanto a resistência à ciprofloxacina ocorre apenas quando há mutação em QRDR.

2.7.2 Resistência a Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos conseguem penetrar a parede celular das bactérias gram-negativas e uma vez dentro da célula bacteriana, os aminoglicosídeos ligam-se à sub-unidade ribossomal 16S e causam um erro na leitura do código genético, interrompendo a síntese de proteína bacteriana normal. Isto leva a alterações na permeabilidade da membrana celular, resultando em absorção adicional de antibiótico, ruptura celular e subsequente morte celular (Dowling, 2013a).

A resistência bacteriana aos aminoglicosídeos pode resultar de três causas:

- Diminuição da permeabilidade da membrana;
- Modificação do RNA 16S ou proteínas ribossômicas;
- Modificação enzimática dos aminoglicosídeos.

Em isolados de *P. aeruginosa*, a resistência a aminoglicosídeos é devida principalmente à produção de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos como a acetiltransferase (AAC) que modifica a habilidade do antimicrobiano se ligar ao ribossoma e, conseqüentemente, de inibir a síntese proteica bacteriana. Os genes responsáveis por esta resistência encontram-se geralmente em elementos móveis como plasmídeos ou transposões aumentando assim a probabilidade de propagação da resistência, bem como a co-resistência a outros compostos. (Kitao, Miyoshi-Akiyama, & Kirikae, 2009)

A resistência adaptativa de *P. aeruginosa* tem se mostrado associada com a superprodução da bomba de efluxo RND Mexxy-OprM. O significado clínico da resistência adaptativa é que doses frequentes ou infusões constantes são menos eficazes do que doses altas, uma vez ao dia, uma vez que os aminoglicosídeos agem de maneira dependente da concentração (European Medicines Agency, 2018).

2.7.3 Resistência a Polimixinas

Polimixina E (colistina) e Polimixina B são derivadas do *Paenibacillus (Bacillus) polymyxa var. colistinus*. Começaram a ser usadas clinicamente em animais na década de 1950 e em seres humanos na década de 1960 (European Medicines Agency, 2013). São peptídeos antimicrobianos cíclicos com longas caudas hidrofóbicas que têm como alvo as bactérias gram-negativas. O mecanismo de ação da colistina é essencialmente baseado na interação eletrostática entre os grupos amino carregados positivamente da colistina e os grupos fosfato carregados negativamente das subunidades do lipídio A presentes na estrutura do lipopolissacarídeo (LPS). A colistina altera a estrutura do LPS e leva ao aumento da permeabilidade da membrana celular, resultando em lise celular e morte bacteriana (Blair *et al.*, 2015; Dowling, 2013b; Liu *et al.*, 2017; Rhouma *et al.*, 2016).

O mais importante mecanismo de resistência das polimixinas envolve a modificação da membrana externa, modificando a estrutura do componente lipídico A do LPS, reduzindo a carga global negativa da porção do lipídio A e, portanto, a ligação da colistina. Outros mecanismos incluem modificações adicionais da membrana externa bacteriana e desenvolvimento de bomba de efluxo (Dowling, 2013b; Liu *et al.*, 2017). A resistência à colistina confere resistência conjunta às polimixinas e a uma variedade de outros peptídeos catiónicos (European Medicines Agency, 2013).

A descoberta de gene de resistência mediado por plasmídeo, *mcr-1*, em *E. coli* e posteriormente em outras bactérias gram-negativas, aumentou a preocupação com a propagação da resistência horizontal. Anteriormente a resistência era considerada um

processo estritamente mediado pelo cromossoma bacteriano (resistência vertical) o que significa não ser transferível horizontalmente entre diferentes tipos de bactérias (Liu *et al.*, 2017; Rhouma *et al.*, 2016). Ele foi primeiro identificado em *E. coli* e *K. pneumoniae* na China e depois em todo o mundo em várias espécies da família *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas*. O gene *mcr-1* codifica uma fosfoetanolamina transferase e sua expressão leva a modificações da fosfoetanolamina no lípido A. Em Liu *et al.* (2017) enquanto houve um aumento de resistência para *E. coli* e *K. pneumoniae*, a presença do gene *mcr-1* apenas reduziu moderadamente a suscetibilidade em *P. aeruginosa*.

2.7.4 Resistência a Carbapenemos

Os carbapenemos fazem parte do grupo de antimicrobianos β -lactâmicos assim como as penicilinas, cefalosporinas e monobactams. *P. aeruginosa* é intrinsecamente resistente a β -lactâmicos (Penicilina, Amoxicilina, Cefalosporinas 1^a, 2^a e 3^a geração) com exceção dos Carbapenemos e Monobactams que atravessam rapidamente a membrana externa bacteriana por apresentarem alta afinidade por proteínas ligadoras de penicilina (PBPs) em bactérias gram-negativas (Prescott, 2013).

As Metallo- β -Lactamases (M β ls) são as carbapenemases mais comuns em *P. aeruginosa*, têm a capacidade de hidrolisar praticamente todos os antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos, sendo os monobactams a única exceção. Os genes que codificam as M β ls são encontrados em estruturas genéticas, integrões, que fornecem mobilidade ao gene. Quando estes, integrões se tornam associados com plasmídeos ou transposões a transferência entre bactérias é altamente facilitada. Atualmente são conhecidas cinco subclasses de M β L adquiridas: IMP (imipenemase), VIM (Verona imipenemase), SPM (São Paulo metalo- β -lactamase), GIM (German imipenemase) e SIM-1 (Hyun, Chung, & Hwang, 2018; Mendes *et al.*, 2006; Perez *et al.*, 2014; Queenan & Bush, 2007).

De acordo com Sader *et al.* (2017) e Jiang *et al.* (2006), a resistência aos carbapenemos pode ser decorrente de:

- Diminuição da permeabilidade da membrana externa aos antimicrobianos, pela perda ou expressão reduzida de proteínas de membrana externa - porinas;
- Hiperexpressão de bombas de efluxo, que reduzem a concentração de antimicrobiano no interior das células;
- Produção de enzimas (β -lactamases) que degradam os carbapenemos.

2.8 Suscetibilidade antimicrobiana e Teste de Suscetibilidade a Antimicrobianos

A bactéria patogénica pode ser considerada pelos critérios de classificação clínica em suscetível, intermédia ou resistente a determinado antimicrobiano na avaliação *in vitro*, sendo suscetível quando o antimicrobiano usado na dose recomendada, atinge uma concentração plasmática que inibirá o crescimento ou a eliminará. Intermediário indica que a concentração plasmática do antimicrobiano necessária para inibir o crescimento do organismo não é provável de ser alcançada, mas pode ainda ser usado se alcançar uma alta concentração no local da infeção (por exemplo, β -lactâmicos para o tratamento de infeção do trato urinário inferior em cães). Resistente quer dizer que o antimicrobiano provavelmente não alcançará uma concentração plasmática alta o suficiente para inibir o crescimento da bactéria patogénica e, portanto, não deve ser usado. (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing [EUCAST], 2018; Trott, Moss, See, & Rees, 2007).

O sucesso terapêutico depende não só da atividade intrínseca do antimicrobiano, mas também da concentração que ele atinge no local da infeção. A concentração tem que ser suficiente para se obter o efeito desejado - sub-concentrações de antimicrobianos terminam por selecionar os microrganismos mais resistentes (Prestinaci *et al.*, 2015).

Apesar da orientação de sempre basear a opção terapêutica no conhecimento das suscetibilidades e resistências da bactéria patogénica, assim como garantir a concentração adequada do antimicrobiano no sítio da infeção, a sua escolha muitas vezes ainda é feita de forma empírica. Há registos de que ainda são poucos os clínicos veterinários que prescrevem o antimicrobiano a partir de testes de suscetibilidade (Guardabassi *et al.*, 2017; Pomba *et al.*, 2017; Schwarz *et al.*, 2017).

Os testes de suscetibilidade a antimicrobianos determinam a capacidade que um determinado microrganismo tem de se multiplicar *in vitro*, na presença de diferentes antimicrobianos. Com a interpretação dos resultados o clínico pode prescrever o tratamento mais adequado para o animal, evitando assim o uso incorreto de antimicrobianos e diminuindo o risco de resistências.

Os métodos mais frequentemente utilizados são os da difusão em disco de Kirby-Bauer e o da microdiluição com a determinação da concentração mínima inibitória (CIM), os quais devem ser realizados de acordo com normas padrão, como as publicadas por exemplo pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) ou pelo EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) (Trott *et al.*, 2007)). O CLSI possui uma *guideline* para medicina veterinária, *VET01 | Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals*, enquanto o Eucast criou o comitê VetCAST para lidar com todos os aspetos do teste de suscetibilidade antimicrobiana de agentes patogénicos bacterianos de origem animal e bactérias animais com potencial

zoonótico, mas ainda não lançou nenhum *guideline* com *breakpoints* para antimicrobianos de uso veterinário (*Clinical and Laboratory Standards Institute* [CLSI], 2018; Toutain *et al.*, 2017).

O teste por difusão de disco (DD) é uma das técnicas mais antigas e simples para o teste de suscetibilidade antimicrobiana e continua a ser um dos mais utilizados em laboratórios clínicos de rotina. É adequado para testar a maioria das bactérias patogênicas, incluindo as bactérias fastidiosas mais comuns, e é também versátil em número de agentes antimicrobianos que podem ser testados e não requerem equipamento especial. É um teste qualitativo, realizado em meio sólido, normalmente Muller-Hinton agar, onde o microrganismo é semeado e desafiado com discos feitos de papel filtro impregnado de antimicrobiano com concentrações fixas. Os resultados são interpretados de acordo com o tamanho do halo de inibição do crescimento bacteriano em torno de cada disco de antimicrobiano (Boerlin & White, 2013; Guardabassi *et al.*, 2017). Dá bons resultados para bactérias aeróbias de crescimento rápido. Entretanto, tem como desvantagens o uso em bactérias de crescimento lento, pois estas podem parecer mais suscetíveis devido ao antimicrobiano ter mais tempo para difundir-se no meio e agir na bactéria, e a taxa de difusão do antimicrobiano no meio sólido que também irá interferir no resultado final do teste, pois a capacidade de difusão no meio deve ser suficiente para alcançar uma concentração capaz de inibir ou matar a bactéria (Boerlin & White, 2013).

O teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA) por microdiluição é um teste quantitativo, que indica qual a CIM do antimicrobiano contra determinada bactéria patogênica. O teste é feito em uma placa com 96 poços, cada um com uma concentração determinada de antimicrobiano, é colocada então a solução com a bactéria, incubada 18-24 horas. Após esse tempo a interpretação é feita pela observação da turvação em cada poço e pôr fim a avaliação de qual CIM foi necessária para inibir o crescimento da bactéria. É o teste padrão *gold-standard* para TSA (Guardabassi *et al.*, 2017; Trott *et al.*, 2007).

Deve-se ter cuidado na interpretação dos resultados dos testes de suscetibilidade quanto se a bactéria é sensível ou resistente ao antimicrobiano, pois a concentração mínima inibitória está definida para a terapia sistêmica e não para terapia tópica, e a concentração sérica da fármaco após administração oral é marcadamente mais baixa que a concentração atingida quando o fármaco é administrado topicamente, desta forma pode acontecer que a bactéria seja resistente ao antimicrobiano no teste e na terapêutica tópica seja sensível (European Medicines Agency, 2017; Guardabassi *et al.*, 2017). Para a terapia tópica é difícil definir *in vitro* um parâmetro de CIM pois para muitos antimicrobianos ainda não se conhece quais as concentrações atingidas *in vivo* ou quanto tempo eles são mantidas no local. Além disso, existem múltiplas formulações, incluindo misturas de agentes e administração em horários variados (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2016).

3 Objetivos

Este trabalho tem como objetivo estudar a frequência da resistência a antimicrobianos da bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, proveniente de otite externa de animais de companhia em Lisboa, Portugal. O conhecimento do padrão regional de resistência a antimicrobianos é uma ferramenta indispensável para a escolha, pelo clínico veterinário, da terapêutica apropriada para otite externa.

3.1 Materiais e métodos

3.1.1 Caracterização das amostras

Neste trabalho foram caracterizados 77 estirpes de *Pseudomonas spp.* de uma coleção do Laboratório de Resistência a Antibióticos e Biocidas da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa. Esta coleção é referente a estirpes provenientes de animais de companhia (74 cães e 3 gatos), admitidos em hospitais e clínicas da região de Lisboa durante o período de seis anos (2012 - 2018). Os isolados foram obtidos de Otites externas. As estirpes de *Pseudomonas aeruginosa* estavam conservadas em BHI (*Brain Heart Infusion*, Biokar, contendo 20% (v/v) glicerol (sigma) e mantidas a -20° C. O primeiro passo foi colocar 10µl em água peptonada, incubar por 24h a 37°C. Cada amostra positiva foi semeada em meio MacConkey agar (Biokar Diagnostics, França). Após 24-48h de incubação verificou-se o crescimento das colónias bacterianas não fermentadoras. As colónias suspeitas foram repicadas para meio Columbia + 5% sangue de carneiro (Biomérieux, França) e realizado o teste da Oxidase (Merck).

3.1.2 Extração de DNA

A extração de DNA total (cromossómico e plasmídico) foi realizado pelo método de fervura utilizado pelo Laboratório de Resistência a Antibióticos e Biocidas. Resumidamente, uma fração de cultura pura foi colocada em 1000 µl de água MiliQ e centrifugada a 13000 rpm, durante 8 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi decantado e o *pellet* ressuspenso em 500 µl de água MiliQ. A suspensão foi novamente centrifugada a 13000 rpm, durante 2 minutos. O sobrenadante foi decantado novamente e este último passo repetido mais uma vez. Em seguida ressuspendeu-se o *pellet* em 100 ul de água MiliQ e ferveu-se em banho-maria durante 15 minutos. Voltou-se a centrifugar durante 8 minutos a 13000 rpm. O sobrenadante foi recolhido para um novo tubo de centrifugação e guardado a -20 ° C.

3.1.3 Confirmação da espécie *Pseudomonas aeruginosa* por *Polymerase Chain Reaction*

O método *Polymerase Chain Reaction* (PCR) foi realizado com um volume final de 25 µL contendo água MiliQ esterilizada, Tampão DreamTaq 1x, 3,25 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada desoxirribonucleotido trifosfato (dNTP), 0,5 µM de cada um dos oligonucleótidos iniciadores (Tabela 2), 1,25U de DreamTaq (Fermentas ThermoScientific, Chicago, EUA) e 1,5 µL de DNA. A reação realizada em termociclador (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) compreendeu uma desnaturação inicial a 95°C durante 5 minutos, à qual se seguiram 35 ciclos de desnaturação (30 segundos a 95°C), hibridação (30 segundos a 55°C) e extensão (60 segundos a 72°C), acabando com uma extensão final de 10 minutos a 72°C. De forma a ser possível uma correta interpretação dos resultados, para cada PCR foi utilizado um controlo positivo, DNA de uma estirpe padrão de *P. aeruginosa* previamente sequenciada (ATCC 27853 ou ATCC15442), e um controlo negativo, onde não existia ADN.

Após a amplificação do DNA no termociclador foi efetuada a análise de 10 µL de cada reação de PCR através de uma corrida em gel de agarose (Nzytech, Lisboa, Portugal) 1,5% (p/v) em tampão tris-borato-EDTA (TBE) durante 60 minutos a 90V, em tina de eletroforese (VWR). Para cada corrida foram adicionados 5 µL de marcador de peso molecular NZYDNA Ladder V 50-1000pb (NZYtech, Portugal) de forma a estimar os pesos moleculares dos produtos amplificados. Os produtos de PCR foram visualizados recorrendo a um transluminador ultravioleta (Bio-rad). Das 77 amostras iniciais 64 foram confirmadas como da espécie *P. aeruginosa*.

Tabela 3 – Lista de oligonucleótidos iniciadores, com respetivas sequências nucleotídicas, tamanho de produto PCR e referência, utilizados na técnica de PCR para confirmação de espécie.

Oligonucleotídeo Iniciador	Sequencia nucleotídica (5'→3')	Tamanho pb	Referência
PA_ETA_F	5'GCCTTCGAACATCAAGGTGT3'	207	Curr Microbiol. 2012 Jul;65(1):44-53. doi: 10.1007/s00284-012-0126-3
PA_ETA_R	5'CCATGACCACGCTGACC3'		
PA-GS-F	5'GACGGGTGAGTAATGCCTA3'	618	J Clin Microbiol. 2004 May;42(5):2074-9.
PA-GS-R	5'CACTGGTGTCCTTCCTATA3'		

3.1.4 Teste de suscetibilidade a antimicrobianos e Concentração inibitória mínima

Todas as 64 amostras confirmadas como *P. aeruginosa* foram então testadas quanto à suscetibilidade antimicrobiana pela determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), usando o sistema de microdiluição MicroScan®-Neg MIC Panel Tipo 44 (Siemens Healthcare Diagnostics, West Sacramento, CA, EUA). Os fenótipos de suscetibilidade antimicrobiana foram interpretados de acordo com o European Committee on Antimicrobial Susceptibility Test (EUCAST, 2018) e CLSI. O MicroScan®-Neg MIC Panel Tipo 44 contém

33 antimicrobianos, e destes, apenas 15 são efetivamente ativos contra a *P. aeruginosa* devido às suas resistências intrínsecas. Os antimicrobianos anti-pseudomonas testados foram: Amicacina, Aztreoname, Cefepime, Ceftazidima, Ciprofloxacina, Colistina, Doripinemo, Gentamicina, Imipeneme, Levofloxacina, Meropenemo, Norfloxacina, Piperaciclina, Piperaciclina/Tazobactam e Tobramicina.

3.1.5 Pesquisa de genes de resistência

Após a determinação das concentrações inibitórias mínimas foi realizada pesquisa através de PCR nas amostras resistentes ao Imipeneme para detecção de genes que codificam as enzimas metalo β -lactamases sub-classes VIM, IMP e SPM.

Para tal foram utilizados os oligonucleotídeos IMPF, IMPR, SPMF, SPMR, VIMF e VIMR (Tabela 3).

De forma a ser possível uma correta interpretação dos resultados, para cada PCR foram utilizados dois controlos positivos, DNA de uma estirpe padrão previamente sequenciada, detentora dos genes *bla*VIM- e *bla*IMP e um controlo negativo, onde não existia ADN.

Nas amostras resistentes à Ciprofloxacina e a Gentamicina foram pesquisados os genes para a produção da enzima AAC (6') – Ib (Tabela 4).

Tabela 4 - Lista de oligonucleótidos iniciadores, com respetivas sequências nucleotídicas, tamanho de produto PCR e referência, utilizados na técnica de PCR para pesquisa de genes de resistência *bla*_{VIM}-, *bla*_{IMP} e *bla*_{SPM}.

Oligonucleotídeo Iniciador	Sequencia nucleotídica (5'→3')	Tamanho pb	Referência
IMPF	5'GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC3'	232	Poirel et al. 2011 Diag Microb Infect Disease 70:119–123
IMPR	5'GGTTTAAYAAAAACAACCACC 3'		
SPMF	5'AAAATCTGGGTACGCAACG 3'	271	Poirel et al. 2011 Diag Microb Infect Disease 70:119–123
SPMR	5'ACATTATCCGCTGGAACAGG 3'		
VIMF	5'GATGGTGTGTTGGTCGCATA 3'	390	Poirel et al. 2011 Diag Microb Infect Disease 70:119–123
VIMR	5'CGAATGCGCAGCACCAG 3'		

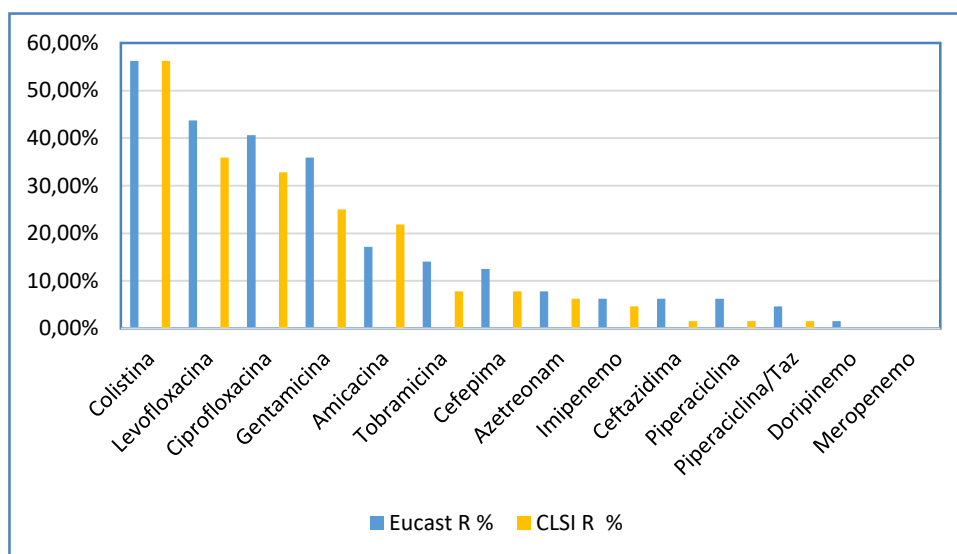
Tabela 5 - Lista de oligonucleótidos iniciadores, com respetivas sequências nucleotídicas, tamanho de produto PCR e referência, utilizados na técnica de PCR para pesquisa de genes para a produção da enzima AAC (6') – Ib.

Oligonucleotídeo Iniciador	Sequencia nucleotídica (5'→3')	Tamanho pb	Referência
AAC6lbf3	5' TTGCGATGCTCTATGAGTGG 3'	482	Robicsek A, Jacoby GA, Hooper DC. Lancet Infect Dis. 2006 Oct;6(10):629-40.
AAC6lbr3	5' CTCGAATGCCTGGCGTGT 3'		

4 Resultados

A interpretação dos resultados do após a determinação das concentrações inibitórias mínimas pelo Eucast em geral obteve maiores níveis de resistência do que a interpretação pelo CLSI, em concordância com os trabalhos de Hombach, Bloemberg, & Böttger, (2012); Wolfensberger *et al.*, (2013) (gráfico1).

Gráfico 1 - Comparação entre o CLSI e o Eucast quanto aos níveis de resistência encontrados



Observa-se no gráfico que em 5 dos 14 (a Norfloxacina tem *breakpoint* apenas pelo CLSI, por isso não há comparação entre as interpretações) antimicrobianos testados (35%) o nível de resistência ficou acima de 10% nas duas interpretações, sendo as fluoroquinolonas e aminoglicosídeos as classes que apresentaram maiores resistências.

Os níveis de resistência encontrados com a interpretação pelo Eucast, do maior para o menor, foram: Colistina (56,3%, n=36/64), Levofloxacina (44%, n=28/64), Ciprofloxacina (41%, n=26/64), Gentamicina (36%, n=23/64), Amicacina (17%, n=11/64), Tobramicina (14%, n=9/64), Cefepima (13%, n=8/64), Aztreonam (7,9%, n=5/64), Imipenem, Ceftazidima e Piperaciclina (6,3%, n=4/64), Piperaciclina/tazobactam (4,7%, n=3/64), Doripenemo (1,6%, n=1/64), Meropenem não houve resistência. Doze amostras (18,8%) foram resistentes tanto a Ciprofloxacina quanto a Gentamicina. Uma amostra mostrou-se resistente tanto ao Imipenem quanto ao Doripenem (Tabela 5).

Os níveis de resistência encontrados com a interpretação pelo CLSI, do maior para o menor, foram: Colistina (56,3%, n=36/64), Norfloxacina (51,6%, n=33/64), Gentamicina (34%, n=23/64), Amicacina (32,9%, n=21/64), Ciprofloxacina (25%, n=16/64), Levofloxacina (21,9%, n=14/64), Aztreonam e Tobramicina (7,9%, n=5/64), Cefepima (12,5%, n=8/64),

Aztreonam (7,8, n=5/64), Imipeneme (6.3%, n=4/64), Piperaciclina/tazobactam (4,7%, n=3/64), Cefepima, Ceftazidima e Piperaciclina (1,6%, n=1/64). Não houve resistência ao Doripeneme e ao Meropeneme (Tabela 5).

Tabela 6 - Resultados das determinações das concentrações inibitórias mínimas realizadas

	CLSI						Eucast					
	S		I		R		S		I		R	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Amicacina	43	67,18%	0	0,00%	21	32,81%	46	71,87%	7	10,93%	11	17,18%
Azetreonam	50	78,12%	9	14,06%	5	7,81%	3	4,68%	56	87,50%	5	7,81%
Cefepima	56	87,50%	7	10,93%	1	1,56%	56	87,50%	0	0,00%	8	12,50%
Ceftazidima	60	93,75%	3	4,68%	1	1,56%	60	93,75%	0	0,00%	4	6,25%
Ciprofloxacina	46	71,87%	2	3,12%	16	25%	38	59,37%	0	0,00%	26	40,62%
Colistina	28	43,75	0	0,00%	36	56,25%	28	43,75	0	0,00%	36	56,25%
Doripinemo	63	98,43%	1	1,56%	0	0,00%	63	98,43%	0	0,00%	1	1,56%
Gentamicina	13	20,31%	28	43,75%	23	35,93%	41	64,06%	0	0,00%	23	35,93%
Imipenemo	57	89,06%	3	4,68%	4	6,25%	60	93,75%	0	0,00%	4	6,25%
Levofloxacina	40	62,50%	10	15,62%	14	21,87%	36	56,25%	0	0,00%	28	43,75%
Meropenemo	63	98,43%	1	1,56%	0	0,00%	63	98,43%	1	1,56%	0	0,00%
Norfloxacina	31	48,43%	0	0,00%	33	51,56%	-	-	-	-	-	-
Piperaciclina	60	93,75%	3	4,68%	1	1,56%	60	93,75%	0	0,00%	4	6,25%
Piperaciclina/Taz	55	85,93%	6	9,37%	3	4,68%	61	95,31%	0	0,00%	3	4,68%
Tobramicina	55	85,93%	4	6,25%	5	7,81%	55	85,93%	0	0,00%	9	14,06%

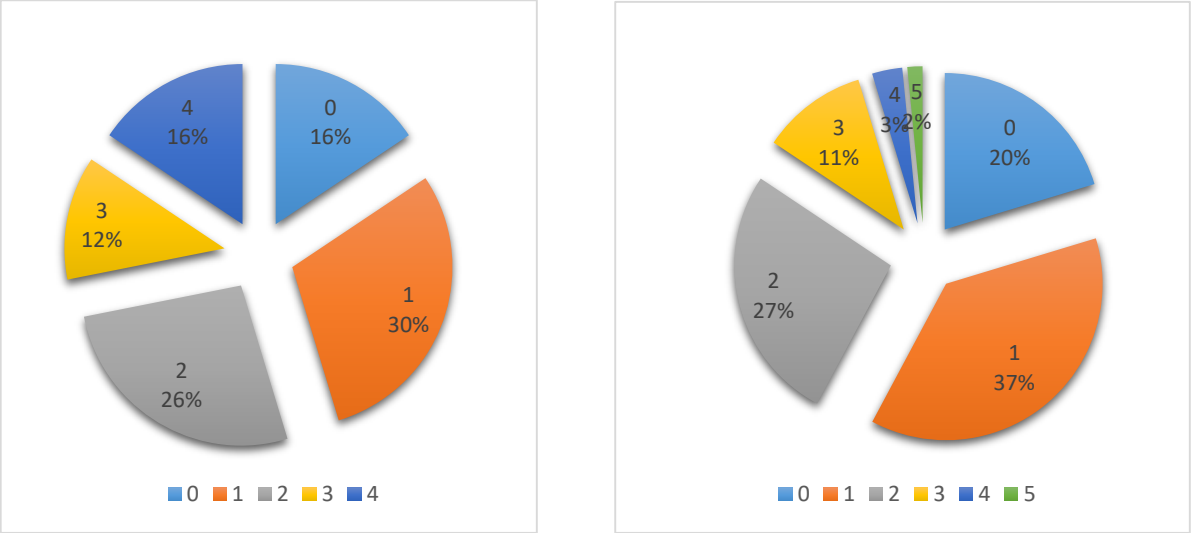
Legenda: Interpretação da CIM onde n = número de amostras (n total = 64 amostras)

S = sensível I = intermediaria R = resistente

A pesquisa por PCR para detecção de genes que codificam as enzimas metalo β -lactamases sub-classes VIM, IMP e SPM nas amostras resistentes ao Imipeneme teve resultado negativo, assim como a pesquisa para os genes *bla_{OxaA}* e *bla_{OxaB}* e para a enzima AAC (6') – Ib nas amostras resistentes a Ciprofloxacina e Gentamicina.

Dezoito amostras (28%) na interpretação pelo Eucast e dez amostras (16%) pelo CLSI foram resistentes a três ou mais classes diferentes de antibióticos, caracterizando desta forma estirpes multirresistentes. Dez amostras pelo Eucast (16%) e treze pelo CLSI (20%) foram sensíveis a todos antimicrobianos anti-pseudomonas testados (Gráfico 2) e das 4 amostras resistentes ao Imipeneme, 3 são multi-resistentes, com co-resistência a aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e colistina na interpretação de ambos os institutos (Gráfico 3).

Gráfico 2 - percentagem de estirpes que são resistentes a determinado número de classes de antimicrobiano



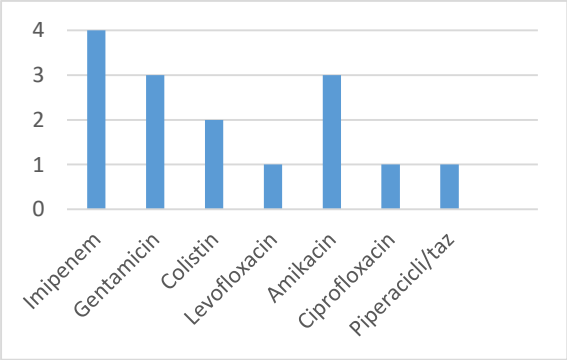
Interpretação pelo Eucast

Interpretação pelo CLSI

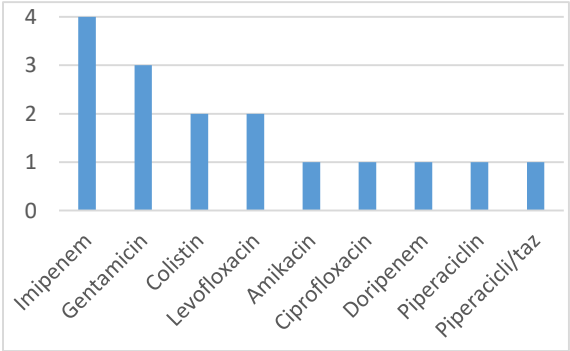
Legenda: na interpretação pelo Eucast, 28% dos isolados estudados foram resistentes a 3 ou mais classes, enquanto que pelo CLSI, 16% foram resistentes a 3 ou mais classes.

Gráfico 3 - co-resistências das estirpes resistentes ao Imipeneme com outros antimicrobianos, tanto pelo CLSI quanto pelo Eucast.

CLSI



Eucast



Legenda: Em ambas interpretações, as estirpes que mostraram resistência ao Imipeneme têm co-resistência a outras classes de antimicrobianos.

5 Discussão

Com este estudo pretendeu-se conhecer e aprofundar o conhecimento das resistências antimicrobianas em Portugal, em estirpes de *P. aeruginosa* isoladas de otites externas, que é uma das afeções que mais leva os proprietários a procurarem o médico veterinário, e entender a sua implicação na saúde pública.

Alguns estudos tem sido feitos para determinar a frequência de resistência a antimicrobianos em *P. aeruginosa* provenientes de otites externas de animais de companhia. Contudo para avaliação da suscetibilidade a antimicrobianos, diferentes métodos (CIM ou DD) foram utilizados pelos autores estudados. Para além dos diferentes métodos, o ano dos estudos também varia, sendo estes fatores importantes em termos de interpretação de resultados, uma vez que as *guidelines* de interpretação têm sofrido anualmente actualizações em relação à *P. aeruginosa*. Alguns antimicrobianos possuem *breakpoints* (critérios de classificação clínica) mais baixos no Eucast do que no CLSI, o que significa mais resultados resistentes na interpretação pelo Eucast, como é o caso do cefepime, ceftazidime, doripenemo, imipeneme, aztreonam, ciprofloxacina, levofloxacina, gentamicina, tobramicina e piperaciclina. Neste estudo a discussão será baseada nos resultados encontrados pela interpretação do CLSI tendo em conta que todos os trabalhos veterinários pesquisados foram interpretados pelos critérios deste Instituto.

As duas tabelas a seguir, tabela 6 e 7, mostram os trabalhos pesquisados divididas de acordo com o método utilizado para realização do TSA (CIM ou DD), quais antimicrobianos foram testados e qual o nível de resistência observado. Deve-se notar que os trabalhos mais antigos teriam, se avaliados hoje, níveis mais elevados de resistência devido a actualizações da interpretação dos *breakpoints* pelo CLSI. Todos os trabalhos são sobre otites ou otites e piodermites em animais de companhia e interpretados pelo CLSI.

Para comparação com os resultados observados no presente estudo, serão utilizados os trabalhos realizados pelo método da microdiluição (CIM) onde os mesmos antimicrobianos tenham sido pesquisados. Os trabalhos de Vingopoulou *et al.*, 2018; Kroemer *et al.*, 2014 e McKay *et al.*, 2007 pesquisaram fluoroquinolonas que diferem daquelas estudadas neste trabalho.

Autor	País do estudo	Pip/taz (% R)	Caz (% R)	Cef (% R)	Imp (% R)	Gent (% R)	Ami (% R)	Cip (% R)	Enr (% R)	Orb (% R)	Marb (% R)	Mer (% R)	Levo (% R)	Tob (% R)
Vingopoulou et al, 2018	Grécia								44		32			
Beier et al, 2014	EUA					9		5	16	43			7	
Kroemer et al, 2014	França, Bélgica, Alemanha, Reino Unido, Espanha e Holanda										18,94			
Lin et al, 2012	China		3,7		0	14,8	11,1	14,8	14,8				14,8	14,8
Rubin et al, 2008	EUA	5	6	4	1	7	3	16	31	52	27	1	16	
McKay et al, 2007	EUA								53	65	49			

Tabela 7 - trabalhos realizados pelo método da microdiluição (CIM)

Legenda: Pip/taz (piperaciclina/tazobactam); Caz (ceftazidima); Cef (Cefepime); Imp (imipenem); Gent (gentamicina); Ami (amicacina); Cip (ciprofloxacina); Enr (enrofloxacina); Orb (orbifloxacina); Marb (marbofloxacina); Mer (meropeneme); Levo (levofloxacina); Tob (tobramicina). %R – percentagem de estirpes resistentes.

Autor	País do estudo	Pip (% R)	Pip/taz (% R)	Caz (% R)	Cef (% R)	Imp (% R)	Mer (% R)	Azt (% R)	Col (% R)	Gent (% R)	Tob (% R)	Ami (% R)	Cip (% R)	Enr (% R)	Orb (% R)	Marb (% R)	Poli B (% R)	Ofx (% R)
Hyun et al, 2018	Koreia	8,8	5	13,8	23,8	12,5	16,3	11,3	2,5	26,3	18,8	22,5	17,5				3,8	26,3
de Martino et al, 2016	Itália									8,7				43,5				
Ludwig et al, 2016	República Tcheca, França, Alemanha, Hungria, Itália, Holanda, Polónia, Espanha, Suécia e Reino Unido									18,8				18,2				
Kroemer et al, 2014	França, Bélgica, Alemanha, Reino Unido, Espanha e Holanda													83		27		
Bugden et al, 2013	Austrália									5				36			7	
Harada et al, 2012	Japão	1,4	1,4	1,4		0		12,3		41		1,4	20,5	31,5	34,2			
Malayeri et al, 2010	Teerã									10		0		0				
Wildermuth et al, 2007	EUA												15,6	43,8		33,3		
Lyskova et al, 2007	República Tcheca	0								0			0	71,4				42,9
McKay et al, 2007	EUA													50		46		

Tabela 8 - trabalhos realizados pelo método de disco difusão (DD)

Legenda: Pip (piperaciclina); Pip/taz (piperaciclina/tazobactam); Caz (ceftazidima); Imp (imipenem); Mer (meropenemo); Azt (aztreonam); Col (colistina); Gent (gentamicina); Ami (amicacina); Cip (ciprofloxacina); Enr (enrofloxacina); Orb (orbifloxacina); Marb (marbofloxacina); Poli B (polimixina B); Ofx (ofloxacina). %R – percentagem de estirpes resistentes.

As classes de antimicrobianos mais utilizados no tratamento de otite externa em animais de companhia são as Fluoroquinolonas e os Aminoglicosídeos (Nuttall, 2016; Paterson, 2016; Steen & Paterson, 2012). No presente estudo estas classes demonstraram os mais altos índices de resistência e este resultado é compatível com o estudo de Lin *et al.*, 2012.

As fluoroquinolonas Ciprofloxacin, Levofloxacin e Norfloxacin foram avaliadas, todas com altos níveis de resistência tanto pelo CLSI, quanto pelo EUCAST (não há *breakpoint* para Norfloxacin), cujo resultado difere de Beier (2015), que encontrou baixo nível de resistência para a levofloxacin e ciprofloxacin, e altos níveis para orbifloxacin e enrofloxacin, mas é compatível com Lin *et al.* (2012) e Rubin *et al.* (2008). Das fluoroquinolonas atualmente disponíveis, humanas ou veterinárias, a ciprofloxacin é a mais ativa contra *P. aeruginosa*, seguida pela marbofloxacin, enrofloxacin, difloxacin e orbifloxacin (Beier *et al.*, 2015; Papich, 2013; Rubin *et al.*, 2008). Vingopoulou, et al (2018), avaliaram a resistência às fluoroquinolonas veterinárias em 75 amostras de *P. aeruginosa* proveniente de otites externas de animais de companhia e encontraram níveis de resistência acima de 30% para Pradofloxacin, Enrofloxacin e Marbofloxacin em ordem da mais resistente para a mais suscetível.

Em termos do uso de fluoroquinolonas em medicina veterinária para tratamento de infecções causadas por *Pseudomonas* spp., têm sido objeto de vários estudos que indicam que para o tratamento clínico o resultado do teste de suscetibilidade da ciprofloxacin não extrapola o resultado para a enrofloxacin, uma vez que alguns isolados podem ser suscetíveis à ciprofloxacin, mas resistentes à enrofloxacin. No entanto, é importante referir que estes estudos têm sido realizados apenas *in vitro*, não existindo resultados de testes *in vivo* até a publicação deste trabalho que confirmem a possibilidade de ciprofloxacin não ser um indicador da suscetibilidade da enrofloxacin (Cole *et al.*, 2006; Riddle, Lemons, Papich, & Altier, 2000; Tejedor, Martín, Navia, Freixes, & Vila, 2003)

O estudo de Lin *et al.* publicado em 2012 encontrou os maiores níveis de resistência na classe das fluoroquinolonas e aminoglicosídeos. Apesar de os valores encontrados serem mais baixos do que os encontrados neste trabalho, mantem-se a maior prevalência nestas classes, sendo que as diferenças nos níveis encontrados podem ser devidas ao menor número de amostras estudadas -27 amostras, ao documento do CLSI mais antigo com *breakpoints* com valores mais elevados e diferenças regionais – China/Portugal.

Os antimicrobianos da classe dos aminoglicosídeos são amplamente utilizados em medicina veterinária, e em diferentes espécies animais, incluindo animais produtores de alimentos e animais de companhia. Um fator de preocupação na questão de resistência é que os mesmos genes de resistência já foram encontrados em isolados de animais e seres humanos (European Medicines Agency, 2017, 2018). Apesar disso, a gentamicina e a tobramicina ainda são consideradas eficazes no tratamento tópico da otite externa causada

por *P. aeruginosa* (Barnard e Foster, 2017). No presente trabalho a tobramicina, com menos de 10% dos isolados resistentes, mostrou-se mais eficaz *in vitro* do que a gentamicina, diferente de Lin *et al.* (2012) que observou similaridade de resistência para ambos antimicrobianos.

Este trabalho difere também de Beier *et al.* (2015); Lin *et al.* (2012) e Rubin *et al.* (2008) que encontraram níveis mais baixos de resistência para a gentamicina de 9%, 14% e 7% respectivamente contra 23% encontrados neste trabalho. Esta diferença também foi observada quanto aos níveis de resistência da amicacina tendo Lin *et al.* (2012) e Rubin *et al.* (2008) encontrado baixos níveis de resistência 3 e 8% respectivamente contra 21% neste trabalho. Deve-se observar que estes valores seriam mais elevados se interpretados com as normas atuais do CLSI.

Em relação às cefalosporinas de 3ª e 4ª gerações, ceftazidima e cefepima respectivamente, este trabalho encontrou um baixo nível de resistência, apenas 1% para ambas. Lin *et al.* (2012) registraram níveis mais altos de resistência para ceftazidima, 3,7%, enquanto Rubin *et al.* (2008) encontraram valores ainda mais elevados para ceftazidima, 6% e 4% para cefepima.

Atenção especial deve ser dada aos carbapenemos, por ser considerada a classe de antimicrobiano de escolha para tratamento hospitalar de *P. aeruginosa* multiresistentes em infecções humanas (Esposito & Simone, 2017), e é preocupante o fato de haver registro de resistência a esta classe em animais já que é uma classe de antimicrobiano classificada como criticamente importante pela OMS e não liberado para uso em animais (Rubin *et al.*, 2008; Yang Wang, 2014). O nível de resistência encontrado neste estudo para o Imipeneme (6,25%, n=4/64) foi mais elevado do que em relação a trabalhos realizados por outros autores como Rubin *et al.*, 2008 que detetou apenas 1% (n=1/106) de resistência e Lin, 2012 que não encontrou resistência a este antimicrobiano. Esta discrepância de resultados pode ser pela diferença regional (EUA e China) e/ou pelos critérios de interpretação utilizados, como por exemplo o documento do CLSI mais antigo, uma vez que os critérios de interpretação para a suscetibilidade aos antimicrobianos, especialmente no caso da *P. aeruginosa*, têm vindo a sofrer alterações ao longo dos anos. Em termos de comparação com estudos que realizaram o TSA por difusão de disco há discrepância com o trabalho de Hyun, Chung, & Hwang, 2018, cujo resultados com níveis de resistência acima de 10% para Imipeneme e Meropeneme diferem do presente trabalho e também do trabalho de Harada, Arima, Niina, Kataoka, & Takahashi, 2012 que não encontraram resistência para o Imipeneme. Contudo, não é ideal fazer comparação de resultados com diferentes metodologias (CIM ou DD).

O resultado negativo nos PCR para a detecção dos genes *bla_{VIM}* e *bla_{IMP}* poderá dever-se à existência de bombas de efluxo ou à diminuição da permeabilidade (expressão reduzida de

porinas) da membrana externa (Castanheira *et al.*, 2014), contudo a pesquisa de bombas de efluxo não foi objeto deste estudo.

Em relação à colistina (polimixina E), em 2016 um grupo de trabalho conjunto do Eucast e CLSI recomendou apenas o método de diluição em meio líquido como referência para determinação da suscetibilidade deste antimicrobiano, uma vez que a colistina é uma molécula grande com fraca difusão em meio sólido, o que gera taxas de erro inaceitavelmente altas. A microdiluição deve ser realizada usando placas de microtitulação de polipropileno não revestidas; meio líquido Mueller-Hinton com ajuste de cátions sem quaisquer outros aditivos (EUCAST, 2016). Têm sido feitos estudos para melhor compreensão da eficácia dos diferentes métodos de TSA para as polimixinas, já que além da fraca difusão em meio sólido, sabe-se que a colistina adere à superfície das placas de poliestireno, o que provoca erro na interpretação dos resultados, por isso as placas de polipropileno são as mais indicadas para realização do TSA (Bakthavatchalam & Veeraraghavan, 2017; Karvanen, Malmberg, Friberg, & Cars, 2017; E. Matuschek, Åhman, Webster, & Kahlmeter, 2018). Neste trabalho foi utilizado a placa comercial MicroScan®-Neg MIC Panel Tipo 44 (*Siemens Healthcare Diagnostics, West Sacramento, CA, EUA*).

Este trabalho encontrou um nível alto de resistência à colistina e apenas um trabalho veterinário que testou a colistina e obteve valor mais baixo, mas a pesquisa foi feita pelo método de difusão em disco (Hyun *et al.*, 2018). O alto nível de resistência encontrado no presente trabalho é um dado preocupante e uma investigação mais profunda é necessária para determinar se o poço de colistina MicroScan® pode ou não ser usado para detectar a resistência à colistina (Lutgring & Burd, 2017).

Comparando com a medicina humana, em nenhum trabalho pesquisado se observaram altos níveis de resistência de *P. aeruginosa* para a colistina (Caselli, Accolti, Soffritti, Piffanelli, & Mazzacane, 2018; Karlowsky *et al.*, 2018; Sader *et al.*, 2017), mas os resultados são contraditórios entre os autores devido à já citada dificuldade da realização do TSA e falta de uma padronização nos métodos utilizados nos laboratórios (Karvanen *et al.*, 2017; Erika Matuschek, Åhman, Webster, & Kahlmeter, 2017; Simner *et al.*, 2018).

A colistina difere da polimixina B, apenas por um aminoácido na posição 6 (D-leucina em colistina, fenilalanina em polimixina B). Ambos os compostos têm o mesmo mecanismo de ação e desenvolvimento de resistência as duas polimixinas tem um espectro similar de atividade antimicrobiana contra as principais bactérias gram-negativas (European Medicines Agency, 2013). Neste trabalho a polimixina B não foi testada, contudo o resultado do TSA da colistina pode ser extrapolado para a polimixina B segundo Helio S. Sader, (2015), que em sua pesquisa encontrou um alto nível de concordância entre as CIMs da colistina e da polimixina B para *P. aeruginosa*. Tendo isso em conta (Pietschmann, Meyer, Voget, & Cieslicki, 2013) observaram que o resultado *in vitro* para polimixina B em *P. aeruginosa* de

otites não obteve bom resultado quando testada sozinha, mas obteve bom resultado em sinergia com o antifúngico miconazol.

As infecções nosocomiais graves devidas a bactérias gram-negativas multirresistentes (MDR) são cada vez mais responsáveis por elevada morbidade e mortalidade em seres humanos e a colistina é hoje em dia um último recurso para o tratamento sistémico de infecções causadas por MDR, inclusive por *P. aeruginosa* (European Medicines Agency, 2013; Girardello & Gales, 2012; Toutain *et al.*, 2017).

Em medicina veterinária a colistina tem sido usada regularmente tanto como tratamento curativo quanto para prevenção de doenças. É de importância terapêutica para o tratamento de infecções gastrointestinais provocadas por bactérias gram-negativas em certas espécies produtoras de alimentos, como os suínos, sendo administrada predominantemente como tratamento em grupo, utilizando a via oral de administração. Em 2013, as polimixinas (principalmente colistina) foram o 5º grupo mais vendido de antimicrobianos (6,1%), com base nas vendas totais de polimixinas em 26 países da UE / EEE (Catry *et al.*, 2015; European Medicines Agency, 2013; Rhouma *et al.*, 2016). Em animais de companhia, a polimixina B é mais utilizada para tratamento de otites externas. (Pietschmann *et al.*, 2013; Prescott, 2013).

Os testes de suscetibilidade a antimicrobianos em casos de otite externa devem ser avaliados com atenção, pois muitas formulações tópicas contêm concentrações mais altas de antimicrobianos do que as formulações para uso sistémico. Como resultado, após administração tópica, a concentração no local da infeção pode exceder a CIM para o a bactéria patogénica, mesmo que este seja considerado resistente se o mesmo antimicrobiano for administrado sistemicamente (Trott *et al.*, 2007)

Os microrganismos resistentes a antimicrobianos, incluindo os multirresistentes, são frequentemente responsáveis por infeções associadas aos cuidados de saúde, mas são também responsáveis por infeções em doentes fora dos hospitais, podendo ser encontrados como parte do microbioma normal de indivíduos saudáveis, em animais de companhia e no ambiente (Argudín *et al.*, 2017; ECDC, 2009).

6 Conclusão

O presente estudo indicou que nos animais de companhia em Portugal, otites infecciosas com resistência aos antimicrobianos comumente utilizados para *P. aeruginosa* estão ocorrendo em diferentes níveis. Alto nível para colistina, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos e baixo, mas preocupante nível de resistência ao Imipeneme. Estes achados ressaltam a necessidade de monitorização contínua da resistência entre as bactérias patogénicas dos animais e o valor do TSA como base para as decisões no tratamento clínico, lembrando que os valores encontrados no TSA são para a terapia sistémica, e que na terapia tópica as concentrações atingidas do antimicrobiano são maiores podendo em muitos casos ocasionar resposta clínica adequada mesmo o TSA indicando resistência.

É importante o médico veterinário conhecer o perfil de resistência bacteriana na região onde trabalha, para melhor conduzir o tratamento do seu paciente e melhor informar o proprietário do animal. Não se pode ignorar que um tutor com imunodeficiências é mais propenso a infeções, e ainda que a otite externa não seja uma doença infectocontagiosa, o contato próximo do animal com o ser humano propicia transferência de bactérias patogénicas entre as espécies.

7 Referências

- Alhazmi, A. (2015). *Pseudomonas aeruginosa – Pathogenesis and Pathogenic Mechanisms. International Journal of Biology*, 7(2), 44–67.
- Arais, L. R., Barbosa, A. V., Carvalho, C. A., & Cerqueira, A. M. F. (2016). Antimicrobial resistance, integron carriage, and gyrA and gyrB mutations in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from dogs with otitis externa and pyoderma in Brazil. *Veterinary Dermatology*, 27(2), 113-e31.
- Argudín, M., Deplano, A., Meghraoui, A., Dodémont, M., Heinrichs, A., Denis, O., Nonhof, C., Roisin, S. (2017). *Bacteria from Animals as a Pool of Antimicrobial Resistance Genes. Antibiotics* (Vol. 6).
- Bakthavatchalam, Y. D., & Veeraraghavan, B. (2017). Challenges, issues and warnings from CLSI and EUCAST working group on polymyxin susceptibility testing. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 11(8),
- Baptista, M. G. D. F. M. (2013). Mecanismos de Resistência aos Antibióticos. *Dissertação de Mestrado, Lisboa, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia Faculdade de Ciências e Tecnologias Da Saúde*, 51. Retrieved from [http://recil.grupolusofona.pt/bitstream/handle/10437/3264/Mecanismos de Resistência aos Antibióticos Maria Galvão Ba.pdf?sequence=1](http://recil.grupolusofona.pt/bitstream/handle/10437/3264/Mecanismos%20de%20Resist%C3%ancia%20aos%20Antibioticos%20Maria%20Galv%C3%A3o%20Ba.pdf?sequence=1)
- Barnard, N., & Foster, A. (2017). *Pseudomonas* otitis in dogs: A general practitioner's guide to treatment. *In Practice*, 39(9), 386–398.
- Barnard, N., & Foster, A. (2018). How to treat *Pseudomonas* otitis in dogs. *Veterinary Record*, 182(4), 109–110.
- Bateman, F. L., Moss, S. M., Trott, D. J., & Shipstone, M. A. (2012). Biological efficacy and stability of diluted ticarcillin-clavulanic acid in the topical treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Veterinary Dermatology*, 23(2).
- Beier, R. C., Foley, S. L., Davidson, M. K., White, D. G., Mcdermott, P. F., Bodeis-Jones, S., Zhao, S., Andrews, K., Crippen, T. L., Sheffield, C.L., Poole, T.L., Anderson, R.C. & Nisbet, D. J. (2015). Characterization of antibiotic and disinfectant susceptibility profiles among *Pseudomonas aeruginosa* veterinary isolates recovered during 1994-2003. *Journal of Applied Microbiology*, 118(2), 326–342.
- Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. V. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 13(1), 42–51.
- Boekema, B. K. H. L., Pool, L., & Ulrich, M. M. W. (2013). The effect of a honey based gel and silver sulphadiazine on bacterial infections of in vitro burn wounds. *Burns*, 39(4), 754–759.
- Boerlin, P., & White, D. G. (2013). Antimicrobial Resistance and Its Epidemiology. In S.

- Giguère, J. F. Prescott, & P. M. Dowling (Eds.), *Antimicrobial Therapy In Veterinary Medicine* (5th ed., pp. 21–40).
- Buckley, L. M., McEwan, N. A., & Nuttall, T. (2013). Tris-EDTA significantly enhances antibiotic efficacy against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. *Veterinary Dermatology*, 24(5).
- Bugden, D. L. (2013). Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from dogs with otitis externa in Australia. *Australian Veterinary Journal*, 91(1–2), 43–46.
- Cabassi, C. S., Sala, A., Santospirito, D., Alborali, G. L., Carretto, E., Ghibaud, G., & Taddei, S. (2017). Activity of AMP2041 against human and animal multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 16(1), 17.
- Caselli, E., Accolti, M. D., Soffritti, I., Piffanelli, M., & Mazzacane, S. (2018). Spread of mcr-1–Driven Colistin Resistance on Hospital Surfaces, Italy Elisabetta. *Emerging Infectious Diseases*, 24(9), 1752–1753.
- Catry, B., Cavaleri, M., Baptiste, K., Grave, K., Grein, K., Holm, A., Jukesd, H., Liebanae, E., Navasf, A. L., Mackayb,D., Magiorakosg,A. P., Romoh, M. A. M., Moulini, G., Maderof, C. M., Pomba, M. C. M. F., Powellk, M., Pyörälä, S., Rantala, M., Ružauskasm, M., Sanders, P., Tealen, C., Threlfallo, E. J., Törnekep,K., Duijkeren, E. & Edo, J. T. (2015). Use of colistin-containing products within the European Union and European Economic Area (EU/EEA): development of resistance in animals and possible impact on human and animal health. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 46(3), 297–306.
- Chatterjee, M., Anju, C. P., Biswas, L., Anil Kumar, V., Gopi Mohan, C., & Biswas, R. (2016). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and alternative therapeutic options. *International Journal of Medical Microbiology*
- Choi, N., Edginton, H. D., Griffin, C. E., & Angus, J. C. (2018). Comparison of two ear cytological collection techniques in dogs with otitis externa. *Veterinary Dermatology*, (May).
- Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI. (2018). VET08 | Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals, 4th Edition.
- Cole, L. K., Kwochka, K. W., Hillier, A., Kowalski, J. J., Smeak, D. D., & Kelbick, N. T. (2006). Ciprofloxacin as a representative of disk diffusion in vitro susceptibility of enrofloxacin for bacterial organisms from the middle-ear tissue of dogs with end-stage otitis externa. *Veterinary Dermatology*, 17(2), 128–133.
- Cole, L. K., Papich, M. G., Kwochka, K. W., Hillier, A., Smeak, D. D., & Lehman, A. M. (2009). Plasma and ear tissue concentrations of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in dogs with chronic end-stage otitis externa after intravenous

- administration of enrofloxacin. *Veterinary Dermatology*, 20(1), 51–59.
- Dotson, M. J., & Hyatt, E. M. (2008). Understanding dog-human companionship. *Journal of Business Research*, 61(5), 457–466.
- Dowling, P. M. (2013a). Aminoglycosides and Aminocyclitols. In Steeve Giguere, John F. Prescott, & P. M. Dowling (Eds.), *Antimicrobial Therapy In Veterinary Medicine* (5^a, pp. 233–255).
- Dowling, P. M. (2013b). Peptide Antibiotics: Polimyxins, Glycopeptides, Bacitracin and Fosfomycin. In *Antimicrobial Therapy In Veterinary Medicine* (5^a, pp. 189–198).
- ECDC. (2009). *The bacterial challenge : time to react. Reproduction* (Vol. 6 July 201).
- ECDC. (2017). Healthcare-associated infections acquired in intensive care units - Annual Epidemiological Report for 2015. <https://Ecdc.Europa.Eu/En/Publications-Data/Legionnaires-Disease-Annual-Epidemiological-Report-2015>, (December), 1–10. Retrieved from https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/AER_for_2015-healthcare-associated-infections.pdf http://ecdc.europa.eu/en/publications/surveillance_reports/annual_epidemiological_report/Pages/epi_index.aspx#sthash.oeOLX1mU.dpuf
- Esposito, S., & Simone, G. De. (2017). Update on the main MDR pathogens: prevalence and treatment options. *Le Infezioni in Medicina*, (4), 301–310.
- EUCAST. (2016). Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) As recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group. [Http://Www.Eucast.Org](http://www.Eucast.Org), (March, 22), 2016. <https://doi.org/22.03.16>
- European Centre for Disease Prevention and Control. (2017). *Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2016. Annual report of the European Antimicrobial REsistance Surveillance Network (EARS-Net)*. <https://doi.org/10.2900/296939>
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (2016). *Breakpoints for topical use of antimicrobial agents*. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Retrieved from http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Topicals_guidance_note_v2.pdf
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - EUCAST. (2018). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 8.0. Retrieved from http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/.
- European Medicines Agency. (2013). Overview of comments received on “Updated advice on the use of colistin products in animals within the European Union: development of resistance and possible impact on human and animal health,” 44(July), 25. <https://doi.org/EMA/755938/2012>
- European Medicines Agency. (2017). *Sales of veterinary antimicrobial agents in 30*

- European countries in 2015: Trends from 2010 to 2015 Seventh ESVAC report. European Medicines Agency.* <https://doi.org/10.2809/676974>
- European Medicines Agency. (2018). Reflection paper on use of aminoglycosides in animals in the European Union: development of resistance and impact on human and animal health. from http://www.ema.europa.eu/use-aminoglycosides-animals-european-union-development-resistance-impact-human-animal-healthic_Discussion/veterinary/000129/WC500068716.pdf
- Fernandes, M. R., Sellera, F. P., Moura, Q., Carvalho, M. P. N., Rosato, P. N., Cerdeira, L., & Lincopan, N. (2018). Zooanthroponotic Transmission of Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 24(6), 7–9.
- Forster, S. L., Real, T., Doucette, K. P., & King, S. B. (2018). A randomized placebo-controlled trial of the efficacy and safety of a terbinafine, florfenicol and betamethasone topical ear formulation in dogs for the treatment of bacterial and / or fungal otitis externa. *BMC Veterinary Research*, 14 (262), 1–11.
- Gellatly, S. L., & Hancock, R. E. W. (2013). *Pseudomonas aeruginosa*: New insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens and Disease*, 67(3), 159–173.
- Ghibaud, G., Santospirito, D., Sala, A., Flisi, S., Taddei, S., Cavirani, S., & Cabassi, C. S. (2016). In vitro antimicrobial activity of a gel containing antimicrobial peptide AMP2041, chlorhexidine digluconate and Tris-EDTA on clinical isolates of *pseudomonas aeruginosa* from canine otitis. *Veterinary Dermatology*, 27(5).
- Girardello, R., & Gales, A. C. (2012). Resistência às Polimixinas: velhos antibióticos, últimas opções terapêuticas Polymyxins resistance: old antimicrobials, last therapeutic options. *Rev Epidemiol Control Infect*, 2(2), 66–69.
- Guardabassi, L., Damborg, P., Stamm, I., Kopp, P. A., Broens, E. M., & Toutain, P. L. (2017). Diagnostic microbiology in veterinary dermatology: present and future. *Veterinary Dermatology*, 28(1), 146–e30.
- Guardabassi, L., Schwarz, S., & Lloyd, D. H. (2004). Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54(July), 321–332.
- Harada, K., Arima, S., Niina, A., Kataoka, Y., & Takahashi, T. (2012). Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from dogs and cats in Japan: Current status of antimicrobial resistance and prevailing resistance mechanisms. *Microbiology and Immunology*, 56(2), 123–127.
- Hombach, M., Bloemberg, G. V., & Böttger, E. C. (2012). Effects of clinical breakpoint changes in CLSI guidelines 2010/2011 and EUCAST guidelines 2011 on antibiotic susceptibility test reporting of Gram-negative bacilli. *Journal of Antimicrobial*

Chemotherapy, 67(3), 622–632.

- Hyun, J. E., Chung, T. H., & Hwang, C. Y. (2018). Identification of VIM-2 metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from dogs with pyoderma and otitis in Korea. *Veterinary Dermatology*, 29(3), 186-e68.
- Jiang, X., Zhang, Z., Li, M., Zhou, D., Ruan, F., & Lu, Y. (2006). Detection of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(9), 2990–2995.
- Karlowsky, J. A., Kazmierczak, K. M., Bouchillon, S. K., De Jonge, B. L. M., Stone, G. G., & Sahm, D. F. (2018). In vitro activity of ceftazidime-avibactam against clinical isolates of enterobacteriaceae and pseudomonas aeruginosa collected in Asia-pacific countries: Results from the INFORM global surveillance program, 2012 to 2015. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(7).
- Karvanen, M., Malmberg, C., Friberg, L. E., & Cars, O. (2017). Colistin Is Extensively Lost during Standard In Vitro Experimental Conditions. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(11), 1–9.
- Kerr, K. G., & Snelling, A. M. (2009). *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. *Journal of Hospital Infection*, 73(4), 338–344.
- Kitao, T., Miyoshi-Akiyama, T., & Kirikae, T. (2009). AAC(6')-Iaf, a Novel Aminoglycoside 6'-N-Acetyltransferase from Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(6), 2327–2334.
- Kümmerer, K. (2004). Resistance in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54(2), 311–320.
- Lin, D., Foley, S. L., Qi, Y., Han, J., Ji, C., Li, R., Wu, C., Shen, J. & Wang, Y. (2012). Characterization of antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from canine infections. *Journal of Applied Microbiology*, 113(1), 16–23.
- Lister, P. D., Wolter, D. J., & Hanson, N. D. (2009). Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(4), 582–610.
- Liu, Y.-Y., Chandler, C. E., Leung, L. M., McElheny, C. L., Mettus, R. T., Shanks, R. M. Q., ... Doi, Y. (2017). Structural Modification of Lipopolysaccharide Conferred by mcr-1 in Gram-Negative ESKAPE Pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(6), 1–9.
- Lloyd, D. H. (2007). Reservoirs of Antimicrobial Resistance in Pet Animals. *Clinical Infectious Diseases*, 45(Supplement 2), S148–S152.
- Lupo, A., Haenni, M., & Madec, J.-Y. (2018). Antimicrobial Resistance in *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas* spp, (May), 1–16.
- Lutgring, J., & Burd, E. (2017). Colistin Susceptibility Testing Using the MicroScan® Colistin

Well.

- Magiorakos, a, Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L., Stelling, B. J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T. & Monnet, D. L. (2011). Bacteria : an International Expert Proposal for Interim Standard Definitions for Acquired Resistance. *Microbiology*, 18(3), 268–281.
- Maruhashi, E., Braz, B. S., Nunes, T., Pomba, C., Belas, A., Duarte-Correia, J. H., & Lourenço, A. M. (2016). Efficacy of medical grade honey in the management of canine otitis externa - a pilot study. *Veterinary Dermatology*, 27(2), 93-e27.
- Matuschek, E., Åhman, J., Webster, C., & Kahlmeter, G. (2017). Évaluation of five commercial MIC methods for colistin antimicrobial susceptibility testing for Gram-negative bacteria. *27th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, (April), Poster P161.
- Matuschek, E., Åhman, J., Webster, C., & Kahlmeter, G. (2018). Antimicrobial susceptibility testing of colistin – evaluation of seven commercial MIC products against standard broth microdilution for *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter* spp. *Clinical Microbiology and Infection*, 24(8), 865–870.
- Mendes, R. E., Castanheira, M., Carlos, A., Pignatari, C., & Gales, A. C. (2006). Metallo- β -lactamases, 42 (2) 103–113.
- Michl, R. K., Beck, J. F., & Mainz, J. G. (2017). Cystic Fibrosis Patient's best friend? Potential Transmission of *Pseudomonas aeruginosa* from a Dog. *Klin Padiatr*, 245–246. Retrieved
- Morris, D. O., Davis, M. F., Palmeiro, B. S., O'Shea, K., & Rankin, S. C. (2017). Molecular and epidemiological characterization of canine *Pseudomonas* otitis using a prospective case-control study design. *Veterinary Dermatology*, 28(1), 118-e25.
- Nuttall, T. (2016). Successful management of otitis externa MANAGING THE DISEASE. *In Practice FOCUS*, (May), 17–22.
- OIE: World Organisation for Animal Health. (2015). OIE LIST OF ANTIMICROBIAL AGENTS OF VETERINARY IMPORTANCE The. Retrieved from http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/Eng_OIE_List_antimicrobials_May2015.pdf
- Papich, M. G. (2013). Antibiotic Treatment of Resistant Infections in Small Animals. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 43(5), 1091–1107.
- Paterson, S. (2016). Topical ear treatment – options, indications and limitations of current therapy. *Journal of Small Animal Practice*, 57(12), 668–678.
- Paterson, S., & Matyskiewicz, W. (2018). A study to evaluate the primary causes associated with *Pseudomonas* otitis in 60 dogs. *Journal of Small Animal Practice*, 59(4), 238–242.

- Perez, F., Hujer, A. M., Marshall, S. H., Ray, A. J., Rather, P. N., Suwantarat, N., Dumford, D., O'Shea, P., Domitrovic, T. N. J., Salata, R. A., Chavda, K. D., Chen, L., Kreiswirth, B. N., Vila, A. J., Haussler, S., Jacobs, M. R. & Bonomo, R. A. (2014). Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Containing *bla*_{VIM-2} and Elements of Salmonella Genomic Island 2: a New Genetic Resistance Determinant in Northeast Ohio. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(10), 5929–5935.
- Perry, L. R., MacLennan, B., Korven, R., & Rawlings, T. A. (2017). Epidemiological study of dogs with otitis externa in Cape Breton, Nova Scotia. *Can Vet J*, 58(FEBRUARY), 168–174.
- Pietschmann, S., Meyer, M., Voget, M., & Cieslicki, M. (2013). The joint in vitro action of polymyxin B and miconazole against pathogens associated with canine otitis externa from three European countries. *Veterinary Dermatology*, 24(4).
- Pinto, C. (2016, March). Portugal tem 6,7 milhões de animais de estimação. *Veterinária Atual*. Retrieved from <https://www.veterinaria-atual.pt/na-clinica/portugal-tem-67-milhoes-de-animais-de-estimacao/>
- Poirel, L., Cattoir, V., & Nordmann, P. (2012). Plasmid-mediated quinolone resistance; interactions between human, animal, and environmental ecologies. *Frontiers in Microbiology*, 3(FEB), 1–7.
- Pomba, C., Rantala, M., Greko, C., Baptiste, K. E., Catry, B., van Duijkeren, E., Mateus, A., Moreno, M. A., Pyo, S., Ruzauskas, M., Sanders, P., Teale, C., Threlfall, E. J., Kunsagi, Z., Torren-Edo, J., Jukes H. & Törneke, K. (2017). Public health risk of antimicrobial resistance transfer from companion animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(4), 957–968.
- Prescott, J. F. (2013). Other Beta-lactam Antibiotics: Beta-lactamase Inhibitors, Carbapenems and Monobactams. In *Antimicrobial Therapy In Veterinary Medicine* (pp. 175–187).
- Prestinaci, F., Pezzotti, P., & Pantosti, A. (2015). Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathogens and Global Health*, 00.
- Pye, C. C., Singh, A., & Weese, J. S. (2014). Evaluation of the impact of tromethamine edetate disodium dihydrate on antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilm in vitro. *Veterinary Dermatology*, 25(2).
- Pye, C. C., Yu, A. A., & Weese, J. S. (2013). Evaluation of biofilm production by *Pseudomonas aeruginosa* from canine ears and the impact of biofilm on antimicrobial susceptibility in vitro. *Veterinary Dermatology*, 24(4).
- Queenan, A. M., & Bush, K. (2007). Carbapenemases: The versatile β -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(3), 440–458.
- Raman, G., Avendano, E. E., Chan, J., Merchant, S., & Puzniak, L. (2018). Risk factors for

- hospitalized patients with resistant or multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections : a systematic review and meta-analysis, 1–14.
- Rhouma, M., Beaudry, F., & Letellier, A. (2016). Resistance to colistin: what is the fate for this antibiotic in pig production? *International Journal of Antimicrobial Agents*, 48(2), 119–126.
- Riddle, C., Lemons, C. L., Papich, M. G., & Altier, C. (2000). Evaluation of ciprofloxacin as a representative of veterinary fluoroquinolones in susceptibility testing. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(4), 1636–1637.
- Rubin, J., Walker, R. D., Blickenstaff, K., Bodeis-Jones, S., & Zhao, S. (2008). Antimicrobial resistance and genetic characterization of fluoroquinolone resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from canine infections. *Veterinary Microbiology*, 131(1–2), 164–172.
- Sader, H. S., Huband, M. D., Castanheira, M., & Flamm, R. K. (2017). Antimicrobial Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*: Results from Four years (2012-2015) of the International Network for Optimal Resistance Monitoring (INFORM) Program in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(January),
- Schwarz, S., Loeffler, A., & Kadlec, K. (2017). Bacterial resistance to antimicrobial agents and its impact on veterinary and human medicine. *Veterinary Dermatology*, 28(1), 82-e19.
- Simner, P. J., Bergman, Y., Trejo, M., Roberts, A. A., Marayan, R., Tekle, T., Campeau, S., Kazmi, A., Bell, D., Lewis S., Tamma, P. D., Humphries, R. & Hindler, J. A. (2018). Two-Site Evaluation of the Colistin Broth Disk Elution Test to Determine Colistin In Vitro Activity Against Gram-Negative Bacilli. *Journal of Clinical Microbiology*, (October), JCM.01163-18.
- Steen, S. I., & Paterson, S. (2012). The susceptibility of *Pseudomonas* spp. isolated from dogs with otitis to topical ear cleaners. *Journal of Small Animal Practice*, 53(10), 599–603.
- Swinney, A., Fazakerley, J., McEwan, N., & Nuttall, T. (2008). Comparative in vitro antimicrobial efficacy of commercial ear cleaners. *Veterinary Dermatology*, 19(6), 373–379.
- Tafur, D., & Villegas, V. (2008). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Infectio*, 12(3), 217–226.
- Tejedor, M. T., Martín, J. L., Navia, M., Freixes, J., & Vila, J. (2003). Mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from canine infections. *Veterinary Microbiology*, 94(4), 295–301.
- Toutain, P. L., Bousquet-Mélou, A., Damborg, P., Ferran, A. A., Mevius, D., Pelligand, L., Veldman, K. T. & Lees, P. (2017). En Route towards European Clinical breakpoints for veterinary antimicrobial susceptibility testing: A position paper explaining the VetCAST

- approach. *Frontiers in Microbiology*, 8(DEC), 1–13.
- Trott, D. J., Moss, S. M., See, A. M., & Rees, R. (2007). Evaluation of disc diffusion and MIC testing for determining susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolates to topical enrofloxacin/silver sulfadiazine. *Australian Veterinary Journal*, 85(11), 464–466.
- Van Boeckel, T. P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B. T., Levin, S. A., Robinson, T. P., Teillant, A. & Laxminarayan, R. (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(18), 5649–5654.
- Vingopoulou, E. I., Delis, G. A., Batzias, G. C., Kaltsogianni, F., Koutinas, A., Kristo, I., ... Siarkou, V. I. (2018). Prevalence and mechanisms of resistance to fluoroquinolones in *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* isolates recovered from dogs suffering from otitis in Greece. *Veterinary Microbiology*, 213(September 2017), 102–107.
- WHO. (2017). *Critically Important Antimicrobials for Human Medicine-5th rev. Geneva;2017. Licence:CCBY-NC-SA 3.0 IGO. World Health Organization.*
- Wildermuth, B. E., Griffin, C. E., Rosenkrantz, W. S., & Boord, M. J. (2007). Susceptibility of *Pseudomonas* Isolates From the Ears and Skin of Dogs to Enrofloxacin, Marbofloxacin, and Ciprofloxacin. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 43(6), 337–341.
- Wolfensberger, A., Sax, H., Weber, R., Zbinden, R., Kuster, S. P., & Hombach, M. (2013). Change of antibiotic susceptibility testing guidelines from CLSI to EUCAST: Influence on cumulative hospital antibiograms. *PLoS ONE*, 8(11), 1–8.
- Zur, G., Gurevich, B., & Elad, D. (2016). Prior antimicrobial use as a risk factor for resistance in selected *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from the skin and ears of dogs. *Veterinary Dermatology*, 27(6), 468-e125.

8 Anexo 1

Poster apresentado no 30th European Veterinary Dermatology Congress

Emergence of carbapenemase-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from otitis externa in companion animals



Claudia Marconi, Adriana Belas, Constança Pomba.

Laboratório de Resistência a Antibióticos e Biocidas, CIISA, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa
Av. da Universidade Técnica, 1300-477, Lisboa, Portugal
cpomba@fmv.ulisboa.pt



Background and Objective

Pseudomonas aeruginosa is a common cause of chronic otitis externa in companion animals, and treatment of these infections is becoming problematic due to the increasing number of multidrug-resistant (MDR) strains. This study aimed to detect and evaluate the frequency of antimicrobial resistance of *P. aeruginosa* in external otitis.

Material and methods

A total of 64 isolates of *P. aeruginosa* from external otitis from companion animals were identified by PCR. All isolates were tested against 15 antimicrobials by determination of minimum inhibitory concentration using the microdilution system MicroScan® - Neg MIC panel Type 44 (Siemens Healthcare Diagnostics). Antimicrobial susceptibility phenotypes were interpreted according to the EUCAST.

Results

Isolates were resistant to amikacin (17.2%, n=11/64), aztreonam (7.8%, n=5/64), cefepime (12.5%, n=8/64), ceftazidime (6.25%, n=4/64), ciprofloxacin (40.6%, n=26/64), colistin (56.3%, n=36/64), doripenem (1.6%, n=1/64), gentamicin (35.9%, n=23/64), imipenem (6.3%, n=4/64), levofloxacin (43.8%, n=28/64), piperacilina (6.3%, n= 4/64), piperacilin/tazobactam (4.7%, n=3/64), tobramycin (14.1%, n=9/64). Variable resistance profiles were observed among *P. aeruginosa* isolates; some were resistant to the aminoglycosides while susceptible to the fluoroquinolones (47.0%, n=11/23). About 28.1% (n=18/64) of the isolates were resistant to 3 or 4 classes of antimicrobials. In 4 samples, resistance to Imipenem was found, of these, 3 are MDR with co-resistances mainly to gentamicin and levofloxacin, and one sample was resistant to imipenem and doripenem. PCR for the VIM and IMP genes were negative.

Conclusion

The antimicrobial susceptibility test in this study demonstrated high resistance levels for the fluoroquinolone and aminoglycoside classes and resistance to Imipenem and Doripenem. To the occurrence of 28.0% of *P. aeruginosa* MDR in this study demonstrated the need for a more accurate antimicrobial therapy based on sensitivity tests studies.

Figure 1. Level of resistance among the 64 isolates

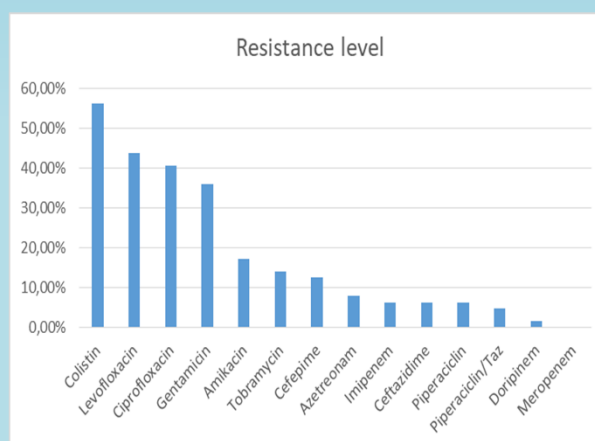
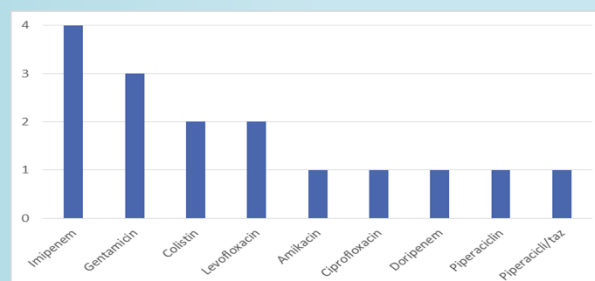


Figure 2. Co-resistance between Imipenem and other antimicrobials



EUROPEAN VETERINARY
DERMATOLOGY CONGRESS
ORGANIZED BY ESVD-ECVD
27-29 SEPTEMBER 2018
DUBROVNIK CROATIA